

منتدى إقرأ الثقافي

في التكنولوجيا الحيوية
www.iqra.ahlamontada.com



المشروع القومي للترجمة

منتدى إقرأ الثقافي

للكتب (كوردى - عربى - فارسى)

www.iqra.ahlamontada.com

إعداد : جينل . ماركس
ترجمة : هاشم أحمد محمد
مراجعة : إبراهيم عبد المقصود إبراهيم

لتحميل أنواع الكتب راجع: (مُنْتَدَى إِقْرَأَ الثَّقَافِي)

پدای داتلود کتابهای مختلف مراجعه: (منتدی اقرا الثقافی)

بۆدابه زاندنی جوهرها کتیب: سەردانی: (مُنْتَدَى إِقْرَأَ الثَّقَافِي)

www.iqra.ahlamontada.com



www.iqra.ahlamontada.com

للکتاب (کوردی , عربی , فارسی)

المشروع القومى للترجمة

**ثورة
فى التكنولوجيا الحيوية**

إعداد : جين ل. ماركس

ترجمة: هاشم أحمد محمد

مراجعة : إبراهيم عبد المقصود إبراهيم



٢٠٠٥

المشروع القومى للترجمة

إشراف: جابر عصفور

– العدد: ٢٩٩

– ثورة فى التكنولوجيا الحيوية

– جين ماركس

– هاشم أحمد

– الطبعة الأولى ٢٠٠٥

هذه ترجمة كتاب:

A Revolution in Biotechnology

Edited by: Jean L. Marx

© International Council of Scientific Unions, 1989

Published on behalf of the ICSU Press

by the Press Syndicate of the

University of Cambridge

حقوق الترجمة والنشر بالعربية محفوظة للمجلس الأعلى للثقافة.

شارع الجبلية بالأوبرا – الجزيرة – القاهرة ت: ٧٣٥٢٣٩٦ فاكس: ٧٣٥٨٠٨٤

El Gabalaya St., Opera House, El Gezira, Cairo

Tel: 7352396 Fax: 7358084

ثورة فى التكنولوجيا الحيوية

بِعون الله وفضله تمت ترجمة هذا الكتاب ومراجعته،والذى يعد من الكتب المهمة فى مجال التكنولوجيا الحيوية،والذى نتقدم به إلى المكتبة العربية،ليكون عوناً بإذن الله للدارسين والباحثين فى مجال التكنولوجيا الحيوية وللقارئ العام. ويشمل هذا الكتاب ستة عشر فصلاً،والتي تعتمد أساساً على دراسة الوراثة والجينات فى الكائنات الحية الدقيقة، ومدى الاستفادة منها فى تخليق البروتين،وكذلك دراسة الأحماض النووية (DNA و RNA)،وكذلك دراسة تثبيت النتروجين ودور البكتيريا فيه.

كما تطرق الكتاب إلى دراسة مزارع الخلايا والأنسجة النباتية ومدى الاستفادة منها فى إنتاج نباتات خالية من الأمراض،ثم إكثار هذه النباتات بكميات كبيرة،وكذلك الاستفادة من هذه التكنولوجيا لكل من مربى النبات والمنتج للمركبات الثانوية التى تدخل فى صناعة الدواء.

وتطرق الكتاب أيضاً إلى دراسة المناعة،ومدى الاستفادة منها فى المجالات الحيوية المختلفة،خاصة فى مجال الطب،ونخص بالذكر استخدام تكنيك الـ ELISA للكشف عن الكثير من الفيروسات،وكذلك دراسة الطرق الحديثة المستخدمة فى تشخيص الأمراض الوراثية،وبالإشارة فى هذا الصدد إلى مستقبل العلاج بالجين للأمراض الوراثية البشرية وفى النهاية،يختم مؤلف الكتاب

بدراسة عن التنافس الدولى والاستراتيجيات التنظيمية فى مجال التكنولوجيا الحيوية.

كما أن هذا الكتاب مزود بمسردين لتفسير المصطلحات العلمية-طبقاً للأبجدية العربية وطبقاً للأبجدية الإنجليزية- المستخدمة فى مجال التكنولوجيا الحيوية، حتى يسهل على القارئ الاستفادة بأكبر قدر من هذه الموضوعات الشيقة التى يحتاج إليها كل دارس للعلوم الحيوية.

ولقد عمّم استخدام التكنولوجيا الحيوية فى مجالات عديدة، وفى المجال الطبى، شملت إنتاج الأدوية والأمصال وتشخيص وعلاج الأمراض الوراثية البشرية، والتقليل من تلوث البيئة، وكذلك إنتاج كيماويات دوائية ومضادات حيوية بتكلفة أقل وبمعدل إنتاجية عالية، كما ساعدت التكنولوجيا الحيوية على إنتاج أمصال تركييبية، خاصة تلك التى ينطوى إنتاجها بالطرق التقليدية على بعض المخاطر، مثل التهاب فيروس الكبد الوبائى.

كما اشتملت أيضاً على إنتاج الأنسولين البكتيرى، البديل عن الأنسولين التقليدى المستخرج من البقر والخنازير، وإنتاج هرمون النمو لمعالجة القزامة البشرية وبطء النمو، وأيضاً إنتاج بروتين الإنترفيرون البشرى، وهو عبارة عن جليكوبروتين فعال ضد الأمراض الفيروسية، ويستفاد منه فى السيطرة على مرض السرطان، حيث يساعد على تثبيط نمو الخلايا السرطانية، ويحفز الجهاز المناعى لاحتواء الخلايا السرطانية ومنع انتشارها، والتشخيص المبكر لبعض الأمراض الوراثية مثل الأنيميا المنجلية والبول الفينولى (RKU).

كما شمل استخدام التكنولوجيا الحيوية أيضاً معالجة الجينات، مثل إضافة جين انتاج الأنسولين فى الكروموسوم البشرى مما يؤدى إلى إمكانية شفاء الإنسان

المريض بمرض البول السكرى شفاء تامًا، وكذلك علاج بعض أمراض نقص المناعة.

وفى المجال البيئى، تعددت استخدامات التكنولوجيا الحيوية التى عالجها هذا الكتاب بالتفصيل ومنها:

إنتاج بكتيريا بحرية مهندسة وراثيًا ، وقادرة على القضاء على التلوث الناشئ من بقع البترول المتسربة فى البحار والمحيطات، حيث تعمل البكتيريا على تحليلها إلى مركبات بسيطة وهضمها، وبذلك يتم التخلص منها، وإنتاج ميكروبات تقوم بمعالجة مياه الصرف الصحى والتخلص من المواد الضارة والروائح وجعلها صالحة لأغراض مختلفة.

وفى المجال الزراعى، كان للتكنولوجيا الحيوية الدور الأكبر، حيث تطورت الأبحاث فى هذا المجال تطورًا فاق التصور، حيث أدت إلى زيادة الإنتاج النباتى والحيوانى، فلقد تم نقل جينات تثبيت النتروجين الجوى والمعروفة باسم جينات *nif*، إلى النباتات النجيلية مثل القمح والشعير والذرة، بحيث جعلتها قادرة على تكوين عقد بكتيرية، وتحصل على احتياجاتها من النتروجين من الجو بدلاً من الاعتماد على الأسمدة النتروجينية، مما يساعد على تقليل تكلفة الإنتاج.

وإنتاج نباتات قطن مقاوم لدودة ورقة القطن، وذلك بإعادة صياغة وكونة جين *BT*، المستخلص من البكتيريا *Bacillus Ehuriengi*، وهو المسئول عن إفراز مادة سامة وقاتلة للدودة، ويتم إدخاله إلى جينوم نباتات القطن أو الطماطم، مما يجعل عصارة أوراق النبات سامة بالنسبة للدودة فيقضى عليها، وتكتسب النباتات صفة المقاومة بدون الحاجة إلى رش المبيدات المكلفة وفى نفس الوقت يؤدي إلى تقليل تلوث البيئة.

نقل صفة المقاومة لمبيدات الحشائش إلى النباتات الاقتصادية خاصة وأن استخدام المبيدات الانتقائية أصبح له محاذير نظرًا للتأثير السام المتبقى وأثره الضار على صحة الإنسان والحيوان، فيتم نقل جين **Glyphosate (G.R.)** **resistant**، الذى يجعل النبات المرغوب مقاومًا للمبيدات ذات المفعول الممتد، بينما تكون الحشائش حساسة لهذا المبيد فتهلك.

وفى مجال الغذاء فللتكنولوجيا الحيوية تأثيرها الواضح فى إنتاج البروتينات المهمة بكميات كبيرة وبتكلفة أقل، باستخدام ما يسمى الناقل المكوكى، وكذلك إنتاج بروتينات عالية القيمة الحيوية، كغذاء للماشية والدواجن، وذلك من الخميرة والبكتيريا، عن طريق إدخال جينات نشطة للسيطرة على بناء البروتين فيها مما يجعلها بمثابة مصانع بيولوجية لإنتاج كميات كبيرة من هذه البروتينات المسماة ببروتينات الكائنات وحيدة الخلية، كما أمكن إنتاج سلالات من الخميرة وميكروبات التخمر المعاد صياغتها، والتي يكون باستطاعتها إنتاج كميات هائلة من الكحوليات والمركبات العضوية بطرق غير تقليدية وبأسعار رخيصة.

وساعدت التكنولوجيا الحيوية أيضًا على نقل صفة المناعة ضد بعض الأمراض الفيروسية إلى الدواجن، وكذلك إنتاج بعض البروتينات البشرية المهمة ذات الأثر الطبى الفعال، مثل عوامل تجلط الدم، وزيادة إدرار ألبان الماشية وصوف الأغنام المحولة وراثيًا.

وإننا لنرى نهضتنا العلمية المباركة وقد شملت جميع وسائل التعليم، فلم يكن بد من أن تتال التكنولوجيا الحيوية نصيبها من الإتيان حتى تسير التطور العلمى اليوم، ولقد اتضح ذلك من إنشاء معاهد الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية فى

الجامعات والمراكز العلمية لتقدم للمجتمع الجديد فى هذا المجال، من أجل حل مشاكل المجتمع فى جميع نواحي الحياة، من زراعة وطب وصيدلة وخلافه. وإننا لنهدى هذا العمل إلى مصرنا الحبيبة راجين الله سبحانه وتعالى أن تكون خطوة فى طريق التقدم العلمى.

د. إبراهيم عبد المقصود إبراهيم

مقدمة المترجم

التكنولوجيا الحيوية هي مجموعة أساليب صناعية تهدف إلى استغلال المادة الحية أو نواتجها من أجل صنع أشياء مفيدة للإنسان، وليست التكنولوجيا الحيوية تكنولوجيا حديثة العهد، لكنها قديمة قدم الإنسان نفسه على وجه الأرض، فخميرة البيرة، التي تستخدم في إنضاج الخبز، على سبيل المثال هي تكنولوجيا حيوية، وبالمثل كل عمليات التخمير التي تقوم بها البكتيريا، تتدرج في هذا المجال، والفرق بين التكنولوجيا الحيوية القديمة والتكنولوجيا الحيوية القائمة حالياً، هو أن الأخيرة تعتمد على الاكتشافات العلمية الحديثة في مجال الوراثة والتطبيق العلمي المبني على الأبحاث الحقلية والتجارب المعملية، بينما كانت تعتمد في الماضي على المحاولة والخطأ.

وتعددت استخدامات التكنولوجيا الحيوية في مجالات كالطب والصيدلة والزراعة وتصنيع الأغذية، وفي مجال التعدين أيضاً، فنجدها في مجال الطب قد ساعدت على ابتكار طرق جديدة للكشف عن الأمراض الوراثية التي عانت البشرية من ويلاتها رشحاً طويلاً من الزمن، بالإضافة إلى اكتشاف طرق لعلاج أمراض العصر كمرض الإيدز والتهاب الكبد الوبائي (ب) .

كما ساهمت التكنولوجيا الحيوية أيضاً في مجال العقاقير من خلال ابتكار عقاقير لعلاج الأمراض البشرية، وساهمت أيضاً بجهد ملحوظ في مجال الزراعة، من خلال تحسين سلالات المحاصيل النباتية، وابتكار مبيدات بيولوجية لمقاومة الآفات الزراعية.

والدول النامية ومن بينها مصر في حاجة ماسة للاستفادة من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية في مجالاتها المختلفة لما لها تأثير مفيد يعود بالخير على

البلاد، لكن ذلك لن يتأتى إلا من خلال تضافر جهود مراكز الأبحاث فى الجامعات والبحث العلمى ودعم الحكومة المباشر من خلال الوزارات المعنية.

وكما أن للتكنولوجيا الحيوية جوانبها المضيئة التى تعود بالنفع على الإنسان، فلها أيضاً جوانبها السيئة، فقد يستخدمها العلماء بطريق الخطأ فى إطلاق كائنات حية لها أثرها السيئ على البيئة، أو قد يجرى استغلالها فى الحروب البيولوجية المدمرة، وعلى أية حال، سوف يؤدى التقدم فى هذه التكنولوجيا إلى إثارة موضوعات جدلية عديدة، والتى سيكون الحكم النهائى فيها لوعى الشعب وإدراكه بإيجابيات وسلبيات هذه التكنولوجيا.

ويشمل هذا الكتاب ستة عشر فصلاً، ناقشت الجوانب المختلفة لاستخدامات التكنولوجيا الحيوية، بالإضافة إلى مسردين أحدهما وفقاً للأبجدية الإنجليزية والآخر وفقاً للأبجدية العربية.

وأرجو أن أكون قد أسهمت بجهد متواضع فى توضيح مفهوم التكنولوجيا الحيوية للقارئ العربى المتعطش للمعرفة، كما أرجو أن يستفيد منه القارئ العام لإثراء معرفته بهذا الموضوع المهم الذى يعتبر جديداً إلى حد ما بالنسبة لنا، ويسير فى ركب التطور الذى تشهده بلادنا فى كافة الميادين.

هاشم أحمد محمد

تقديم بقلم جون كندرو

رئيس المجلس الدولي للاتحادات العلمية

هذا هو أول كتاب في سلسلة الكتب عن موضوعات علمية مهمة للقارئ العام، يرعاها المجلس الدولي للاتحادات العلمية (I C S U)، وهي منظمة عالمية تمثل علماء محترفين، وأهم جزء من مسؤوليتها إطلاع الجمهور على جوانب التقدم العلمي، الذي سيؤثر بدرجة كبيرة على حياتنا، أو الذي سيثرى معارفنا عن العالم الذي نعيش فيه، وإحدى الجهات المنوط بها تنفيذ هذه المهمة، هي وكالة مؤسسة نشر ICSU، التي تنشر هذا الكتاب بالتعاون مع مؤسسة نشر جامعة كامبردج.

ومما لاشك فيه أن التكنولوجيا الحيوية تعد من الموضوعات العلمية المهمة، فخلال السنوات القليلة الماضية، بدأت التكنولوجيا الحيوية في تحويل العديد من أجزاء الكيمياء الصناعية ومن الزراعة والطب، ذلك التحويل الذي خرج من المعمل إلى التطبيق العلمي بسرعة ملفتة للنظر، وقد اختير عنوان الكتاب بدقة بالغة؛ فمما لاشك فيه أنه توجد حالياً ثورة في أساليب وتطبيقات التكنولوجيا الحيوية في حين لا تعتبر التكنولوجيا الحيوية من الموضوعات الجديدة.

وتخمير الجعة، الذي يعد واحداً من أقدم الصناعات في العالم، يعتمد على عملية تكنولوجيا حيوية نموذجية، وتربية الحيوانات الأليفة تعتبر أيضاً تكنولوجيا حيوية، فإذا قبلنا التعريف المألوف للتكنولوجيا الحيوية، على أنه استغلال - أو

استدجان ،تبعاً لوجهة النظر- لكائنات حية أخرى لمنفعة الإنسان، فقد يكون الكائن الحى الآخر: حيوان ثديى كبير مثل بقرة أو خنزير، وقد يكون نبات كالقمح أو البطاطس، أو قد يكون كائناً مجهرياً كالخميرة المستخدمة فى تخمير البيرة، أو بكتيريا، كما هو الحال فى العديد من العمليات التى يتضمنها هذا الكتاب.

وعموماً ،فالإنسان غير راض عن إنتاجية الكائنات الحية الأخرى فى حالتها الطبيعية، وعلى ذلك، فإن تربية الكائن الحيوى(سواء كان نباتاً أم حيواناً أم كائناً مجهرياً) يعد أمراً ضرورياً من أجل إجراء تغير دائم فى التركيب الوراثية للكائن الحى-تغير يحدث فى الرسالة الوراثية التى يمررها إلى نريته-من أجل زيادة الناتج المرغوب،سواء أكان هذا الناتج كحولاً أم بروتيناً أم مادة كربوهيدراتية ، وعلى مدى التاريخ،كانت تربية الكائن الحى العنصر المحدد فى تحسين التكنولوجيا الحيوية،لأن طرق بدائية،كالتى ذكر البعض منها فى العهد القديم ،كانت بطيئة وتجريبية وتجرى بطريقة المحاولة والخطأ، وفى الواقع،فإن طرق التربية لم تتحسن بالقدر الكبير، من حيث المبدأ، حتى فى الأزمنة الحديثة. وقد نشأت الثورة التى أعطت لهذا الكتاب اسمه من خلال اكتشاف طرق جديدة بشكل جذرى لتغيير التركيب الوراثية للكائنات المجهرية بطريقة موجهة، وتتعدّد الآمال فى المستقبل على إمكانية تطور هذه الطرق من حيث المبدأ والواقع العملى لتشمل الكائنات الحية الراقية، أى النباتات والحيوانات، وتعتمد هذه القدرة الجديدة على اكتشافات البيولوجيا الجزيئية من الـ د.ن.أ كمادة وراثية، وعلى الشفرة الوراثية للعلاقة بين الجينات والبروتينات التى تنتجها،

وعلى طرق قراءة الرسالة الوراثية من خلال تسلسل الجينات، وعلى إنزيمات القطع التى يمكن بواسطتها قطع ووصل قطاعات الـ د.ن.أ ببعضها بطريقة دقيقة ، وهذه العناصر والعناصر الأخرى العديدة التى تشكل موضوع يعرف بالوراثة الجزيئية، تجعل من الممكن حالياً تربية كائنات مجهرية حسب الطلب بدلاً من استخدام طريقة المحاولة والخطأ التى كانت تتبع فى العصور القديمة . وكان من نتيجة ذلك، زيادة هائلة فى إمكانات التكنولوجيا الحيوية، حيث تعمل على تحويل جوهر الموضوع كله إلى العديد من التطبيقات الجديدة، التى أصبحت على درجة كبيرة من الأهمية ، ليس فقط للعالم المتقدم، بل للعالم النامى أيضاً، ومن غير المثير للدهشة، فقد جلبت هذه الإمكانيات الجديدة معها مشاكل تنظيمية وأخلاقية جديدة.

وبدأت التكنولوجيا الحيوية تؤثر بالفعل على حياتنا، وسوف يصبح تأثيرها فى المستقبل عظيماً ، ويهدف هذا الكتاب إلى توضيح الخلفية العلمية، وإلى التعريف بما تم تحقيقه بالفعل، وإلى مناقشة المشاكل الأخلاقية، وإلى اقتراح ما يحتمل أن يأتى به المستقبل، وموضوع هذا الكتاب يعد مهماً بما يثيره من متعة فكرية.

الوراثة، و الجينات، و الـ د ن .أ

Heredity, genes and DNA

يقصد بالتكنولوجيا الحيوية استخدام كائنات عضوية حية أو مواد مستخلصة من كائنات عضوية حية لصنع منتجات مفيدة للإنسان ، وتمتد جذور التكنولوجيا الحيوية فى أعماق التاريخ البشرى، حيث وضع أجدادنا الأوائل أصول هذا العلم منذ ما يقرب من مائة قرن مضت، إبان العصر الحجري، عندما بدأوا لأول مرة فى استئناس الحيوانات الأليفة، وزراعة المحاصيل النباتية من أجل الغذاء، بدلاً من اعتمادهم الوحيد على ما يستطيعون جمعه وقنصه من البرية.

والكائنات العضوية المستخدمة حالياً فى التكنولوجيا الحيوية كائنات عضوية يمكن أن تكون كائنات معقدة كماشية الألبان، أو كائنات بسيطة كالخمائر اللازمة لتخمير البيرة وإنتاج الخبز؛ وحتى البكتيريا وحيدة الخلية يمكن الاستفادة منها لأنها تمدنا بعقاقير، تشمل مضادات حيوية مثل البنسلين، بالإضافة إلى عدة منتجات كيميائية معقدة أخرى يصعب الحصول عليها من خلال عمليات التخليق المعملية.

وقد سعى المزارعون والممارسون الآخرون للتكنولوجيا الحيوية دائماً إلى تحسين الكائنات الحية التى يعتمدون عليها فى معيشتهم، وتعتبر تربية الماشية من أجل زيادة إدرار الألبان أحد هذه الأمثلة، ويمكن أيضاً تربية المحاصيل

النباتية لتحقيق غاية تتمثل فى إنتاجية أعلى، أو شدة تحمل أعلى للظروف المناخية والبيئية، أو مقاومة الأمراض.

وقد مهدت ملاحظة بسيطة — بأن الصفات الطبيعية تورث — السبيل لهذه الجهود، فمن السهل أن نرى أن الآباء يورثون ملامحهم الشخصية إلى نريتهم، وتتبع أصل ملامح مولود جديد يعتبر من الطقوس الشائعة فى العائلات، حيث تشبه عيون الابنة عيون أبيها، ويشبه أنفها أنف جدتها.

ويمكن تطبيق ملاحظات وراثية مشابهة موجودة لتحسين الحيوانات الداجنة والنباتات، فمنتج الألبان الذى يرغب فى تحسين إنتاجية الألبان لماشيته، يستطيع أن ينتخب الماشية التى تعطى له إنتاجية عالية، وبطريقة مماثلة، يعمل المزارع أيضاً على تهجين النباتات بصفات مرغوبة، ولا يختار للتزاوج الآخر بعد ذلك إلا الذرية التى ثبت له أنها تحمل الصفة الممتازة أو الصفات التى يبحث عنها.

وقد حققت هذه الجهود المبذولة فى تربية النباتات نجاحات كبيرة، فخلال الفترة من عام ١٩٤٠-١٩٨٠، وصلت غلة الهكتار من محاصيل الحبوب الرئيسية-القمح والذرة والأرز-إلى الضعف أو حتى ثلاثة أمثال ما كانت عليه من قبل "هذه الثورة الخضراء"، التى اشتهرت بذلك الاسم، قد نتجت من زراعة أنواع من الحبوب عالية الإنتاجية، واستخدام كميات كبيرة من الأسمدة التجارية، ومبيدات الآفات، ومبيدات الحشائش. وعلى الرغم من هذه النجاحات، فإن هناك قيوداً على ما يمكن أن تحققة التربية التقليدية ويمكن أن تكون العملية مضیعة للوقت، إذ تتطلب سنوات عديدة لنمو نوع جديد من نبات أو سلالة حيوانية مستقرة وراثياً، وعلاوة على ذلك، فقد لا تكون جميع عمليات التهجين التى

يرغب المربي فى إجرائها على النباتات أو الحيوانات ممكنة، فما يمكنه عمله يتقيد بعدم التوافق الوراثى للأنواع.

والسلالات المختلفة جداً من الناحية الوراثية ، إما أنها لا تنتج ذرية على الإطلاق عند تزاوجها، أو تنتج ذرية عقيمة، وعلى سبيل المثال، فالأرز البرى^(١) قد يتفوق فى بعض الصفات على السلالات المزروعة ، مثل مقاومة ظروف الملوحة أو المرض، فى حين لا يمكن نقل هذه الصفات إلى أرز مزروع بالتهجين الجنىسى.

بالإضافة إلى ذلك، فإن ممارسات الزراعة الحالية باعتمادها على الأسمدة التجارية ومبيدات الآفات تعتبر مكلفة، وغالباً ما لا يمكن تطبيقها فى الدول الفقيرة، التى تشتد فيها الحاجة إلى زيادة إنتاج الغذاء، وقد نبهت الممارسات أيضاً إلى خطورة التدهور البيئى، حيث يمكن أن تتسرب الأسمدة النتروجينية والفوسفاتية إلى المجارى المائية والمياه الجوفية، وغالباً ما يكون للمبيدات الحشرية ومبيدات الآفات تأثيرات سامة على الكائنات العضوية بما فيها الإنسان، خلافاً للغرض المستخدمة من أجله وهو القضاء على الحشرات والأعشاب.

وسوء التغذية والمجاعات التى تسود بقاع كثيرة فى العالم يرجع إلى مشكلة تتعلق أساساً بتوزيع الغذاء، وليس مشكلة نقص فى الغذاء ؛ فلدى الدول المتقدمة وعلى رأسها الولايات المتحدة الأمريكية فائض كبير من الغذاء، فى الوقت الذى تعاني شعوب الدول الفقيرة من عدم القدرة على إنتاج ما يكفيها منه.

(١) الأرز البرى: نبات عشبي مستنقى من النجيليات يزرع للتزيين أو لحبوه الصالحة للأكل والتى تطعمها الطيور المائية المدجنة أيضاً. (معجم الشهابى فى مصطلحات العلوم الزراعية)

وعلى الرغم من هذه المشاكل، فلا يزال عدد سكان العالم يتزايد بصورة مطردة، ووفقاً للإحصاءات التي حصل عليها مكتب الإحصاء الأمريكي US Census Bureau، كان عدد سكان العالم في عام ١٩٨٦ حوالى خمسة مليارات نسمة، ومن المتوقع أن يصل هذا العدد إلى أكثر من ستة مليارات نسمة بحلول عام ٢٠٠٠ وعلاوة على ذلك، فإن معدلات النمو السكاني ستكون أسرع في المناطق التي تعاني من نقص شديد في الغذاء.

ويتزايد عدد سكان الدول النامية الذين يمثلون في الوقت الحالي (عام ١٩٨٩) ما يقرب من ٧٥ ٪ من المجموع الكلى لسكان العالم بمعدلات تصل إلى ثلاث مرات أسرع من سكان الدول المتطورة ، وتشير الأرقام إلى الحاجة إلى إنتاج سلالات جديدة من المحاصيل النباتية عالية الإنتاجية، التي يمكن زراعتها في المناطق القاحلة أو المدارية، دون الحاجة إلى إنفاق المزيد من الأموال على الأسمدة ومبيدات الآفات التي تستخدم حالياً بصورة طبيعية في الدول المتقدمة .

طبيعة الوراثة :

nature of heredity

وعموماً، لم تتطلب الإنجازات التي تمت حتى الآن في تربية النبات والحيوان معرفة مفصلة بالآلية التي تعمل من خلالها الوراثة، ومن المؤكد أن أجداننا في العصر الحجري، لم يكن لديهم دراية بالعناصر الداخلية التي توجه نمو وتطور نبات أو حيوان، وفي واقع الأمر ، لم يبدأ العلماء في معرفة أسس الكيمياء الحيوية للوراثة إلا في فترة الأربعينات والخمسينات من هذا القرن، فنحن نعلم الآن أن التعليمات لبناء مخلوق، سواء كان صغيراً وبسيطاً كالـبكتيريا، أو ضخماً

ومعقداً كالفيل، هي تعليمات مشفرة فى الجينات، ونعرف مما تتكون هذه الجينات
— أى من الحمض النووى الريبى المنقوص الأكسجين DNA، المعروف
بـ د.ن.أ — ونعرف كيف تعمل .

وخلال الخمسة عشر عاماً الماضية على وجه الخصوص، اكتسب العلماء
مهارة غير مسبوقة فى استغلال الجينات، وعزلها، ونسخها، وحتى نقلها إلى
أنواع غريبة، وهذه التطورات التى جاءت نتيجة اكتشاف تكنولوجيا الـ د.ن.أ
المطعم، ظهرت فائدتها العظيمة للعلم الأساسى للبيولوجيا الجزيئية، حيث مكنت
الباحثين من سبر الأغوار العميقة لتركيب الجين ومعرفة وظيفته.

وعلاوة على ذلك، فقد فتحت التطورات مسارات جديدة لتطوير سلالات
مهمة من الناحية الاقتصادية من النباتات والحيوانات ، وبذلك أسهمت فى
الجهود المبذولة لتوفير المزيد من الطعام من أجل عالم يعانى من المجاعة،
وعلى سبيل المثال، وجد العلماء أن بإمكانهم إنتاج فئران تعادل ضعف وزنها
الطبيعى إذا حقنت بجين الهرمون الذى يجعل الحيوانات تنمو بصورة أكبر،
وهناك تجارب مشابهة يجرى تطبيقها على حيوانات المزرعة.

وللبحث العلمى أيضاً فوائد طبية مهمة ، إذ يأمل الإكلينيكيون فى أن يتمكنوا
من علاج بعض الأمراض الوراثية البشرية التى تسببها جينات معيبة، وذلك
بإعطاء المرضى نسخاً جديدة من الجينات السليمة، على الرغم من أنه قد
تمضى سنوات طويلة قبل أن يصبح العلاج باستبدال الجين اختياراً إكلينيكياً
محققاً -إذا أفلح - .

فى هذه الآونة، وفر نقل الجين على نطاق محدود، مصدر جديد لتلك
المنتجات النادرة أو التى من غير الممكن الحصول عليها ، وتشمل هذه

المنتجات هرمون النمو البشري human growth hormone، الذى يستخدم فى علاج الأطفال الذين لا تنمو أجسامهم بطريقة طبيعية ،لأنها لا تصنع الهرمون، والأنسولين البشري human insulin الذى يحتاجه مرضى البول السكرى الذين لم يعد باستطاعتهم تعاطى الأنسولين البقرى bovine insulin ، لأنه أصبح لديهم حساسية ضد هذا العقار، وتصنع الهرمونات بوضع الجينات البشرية فى خلايا بكتيرية أو خلايا أخرى تنمو فى مزرعة المعمل ، والتي يمكن أن تستخدم حينئذ كمصانع حية لهذه المنتجات، ومن البروتينات البشرية الأخرى المهمة طبياً، والتي يجرى إنتاجها بهذا الأسلوب، الأنترفيرونات interferons، والأنترليوكينات interleukins، ويختبر كلا المنتجين لعلاج السرطان.

إسهامات تشارلز داروين وجريجور مندل

The contributions of Charles Darwin and Gregor Mendel

وعلى الرغم من أن معظم المعلومات التى جعلت هذه التطورات ممكنة قد أمكن التوصل إليها خلال الأربعين عاماً الماضية، إلا أن القصة بدأت فعلاً منذ أكثر من مائة وعشرين عاماً مضت، من خلال الأبحاث المستقلة التى قام بها كل من تشارلز داروين (١٨٠٩-١٨٨٢) (شكل ١-١) وجريجور مندل (١٨٢٢-١٨٨٤). فالإسهامات التى قام بها داروين، والتى نال بفضلها جورج جيلورد سيمبسون George Gaylord Simpson تقديراً مباشراً لكونه أبا البيولوجيا الحديثة، ولو أن هذا التقدير لم يكن طيباً دائماً.



شكل ١-١. تشارلز داروين، العالم الطبيعي البريطاني، الذي قمت ملاحظته المستفيضة عن العالم الطبيعي للدعمات الأساسية لنظرية التطور.

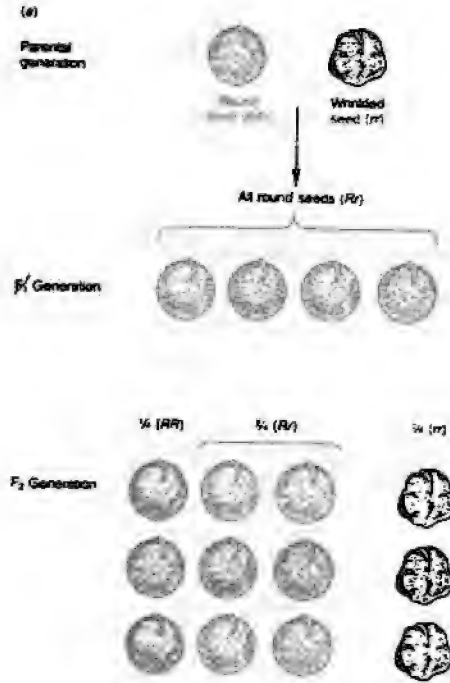
كان داروين عالم الطبيعة، الذي قام بملاحظات مستفيضة ومنظمة عن نباتات وحيوانات العالم، قد توصل من خلال البيانات التي حصل عليها بنفسه ومن الآخرين إلى نتيجة هي أن الأنواع ليست ثابتة ولا تتغير، لكنها تتطور مع الزمن لإنتاج أنواع جديدة، بالإضافة إلى ذلك، قدم داروين تفسيراً محتملاً عن كيفية حدوث هذا التطور. فقد لاحظ أن أفراد نوع من الأنواع، تبدو قدراً كبيراً من التغير، وافترض أن البعض منها يكون ملائماً للبيئة التي يتواجد بها أكثر من الأنواع الأخرى، وبناء على ذلك، ينتج الأفراد الأكثر ملائمة مع البيئة ذرية أكبر من الأفراد الأقل ملائمة مع البيئة، وفي النهاية، سوف تحدث هذه العملية والتي أطلق عليها داروين الانتخاب الطبيعي تغيراً في صفات مجموعة من الكائنات، حيث تبقى وتنتشر الصفات التي فضلت البقاء والتكاثر، بينما تصبح الصفات الأقل تفضيلاً أقل شيوعاً أو تنقرض. ويحدث ما يشبه ذلك في تربية النباتات أو الحيوانات، على الرغم من أن المربي على عكس الطبيعة، تكون لديه القدرة على اختيار الصفات التي يرغب في الاحتفاظ بها، وعلى الرغم من أن العلماء لا يزالون حتى اليوم يجادلون فيما إذا كان التطور يتم عن طريق

الاختيار الطبيعى، كما افترض داروين، إلا أنهم لا يجادلون فى أن الأنواع تتطور.

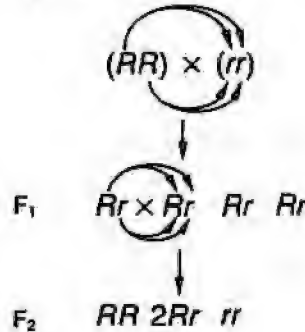
وقد نشر داروين ملاحظاته واستنتاجاته لأول مرة عام ١٨٥٩، فى كتاب باسم "فى أصل الأنواع عن طريق الاختيار الطبيعى، أو بقاء الأنواع المفضلة فى الكفاح من أجل الحياة"، وقد نال الكتاب شهرة كبيرة، وأصبح من أكثر الكتب رواجاً فى ذلك الحين، على الرغم من الجدل الكبير الذى دار حوله بخصوص ما ذكره عن أن الإنسان قد تطور عن بعض صور أخرى من الحياة.

وفى نفس الوقت الذى كان يتمتع فيه داروين بالشهرة التى حظى بها نتيجة أبحاثه، كان الراهب جريجور مندل يعمل منعزلاً فى حدائق الدير بمدينة برنو، التى تقع ضمن إقليم مورافيا، الذى كان تابعا فى ذلك الوقت للنمسا، لكنه الآن جزء من تشيكوسلوفاكيا.

كشفت أبحاث مندل عن القوانين الأساسية التى تحكم الوراثة، وقد قام بهذا أثناء إجرائه تجارب تربية لنبات بازلاء الحديقة، وقام فى إحدى تجاربه بتهجين نباتات البازلاء التى لا تنتج عادة إلا بذوراً ملساء مستديرة مع نباتات لا تنتج إلا بذوراً مجعدة، وجاءت نتيجة التزاوج بذرية من البذور جميعها ملساء، حيث اختفت صفة تجعد البذور من نباتات الجيل الأول (انظر شكل ١-٢).



(شكل ١ - ٢ - أ)



(شكل ١ - ٢ - ب)

شكل ١ - ٢ - أ الورقة في البزلاء. (أ) عندما قام مندل بتزويج نباتات البزلاء التي لا تنتج إلا بذورا مستديرة مع نباتات بزلاء لا تنتج إلا بذورا مجعدة، أعطت جميع نباتات الجيل الأول (ج ١) بذورا مستديرة، لأن صفة "الامتدرة" كانت الصفة السائدة على صفة "لتجعد"، ومع ذلك، فقد احتفظت نباتات البزلاء (ج ١) بجين صفة التجعد المتنحي، وعندما قام بتزويج هذه النباتات مع بعضها البعض مرة أخرى، أنتجت ١/٤ نباتات الجيل الثاني (ج ٢) بذورا مجعدة.

ب - سلوك الجينيات المشفرة عن الصفات السائدة المستديرة والصفات المجعدة المتنحية، للنبات الأم حقيقية التربية، لها إما جينان للصفة المستديرة (م م) أو جينان للصفة المجعدة (م ١ م ١) وعندما يجري ترويض هذه النباتات، فستصبح كل الذرية (م ١ م ١)، ونتيجة لذلك لا تنتج إلا بذورا مستديرة، ومع ذلك، فعندما يتم تزويج نباتان (م ١ م ١)، فسوف يتحد الجينان كما هو موضح بالشكل ليعطيا نبات (م م) ونبات (م ١ م ١) لكل اثنين من نوع (م م ١ م ١). وعلى ذلك، تنتج ١/٣ هذه الذرية بذورا مستديرة، وتنتج ١/٢ النباتات بذورا مجعدة.

ثم مضى مندل فى تزويج نباتات الجيل الأول مع بعضها البعض، وكان لا يزال ثلاثة أرباع الجيل الثانى الناتج ينتج بنوراً ملساء، بينما أصبحت بذور الربع الباقى مرة أخرى مجمعة ، فالصفة التى لم تظهر فى الجيل الأول، عادت وظهرت فى الجيل الثانى، وأظهرت نتائج تجارب تربية مشابهة ، أن صفات أخرى مثل اللون، تتخذ نفس الأسلوب.

علاوة على ذلك، عندما نتبع مندل وراثته صفتين مختلفتين فى نفس الوقت، وجد أنهما يمكن أن يورثا بصورة مستقلة من إحداهما للأخرى، فعندما زواج نباتات تنتج بنوراً صفراء وملتساء مع نباتات تنتج بنوراً خضراء ومجمعة، أنتج نباتات فى الجيل الأول لا تعطى إلا بنوراً صفراء وملتساء ، ومع ذلك، فنباتات الجيل الثانى لم تعط فقط بازلاء بمجموعة الصفتين الأصليتين، لكنها أنتجت أيضاً بعض نباتات البازلاء بمجموعات جديدة من الصفات مجمعة صفراء وملتساء خضراء.

استنتج مندل من هذه النتائج، أن الصفات الوراثية تحمل وتنقل إلى الذرية فى صورة وحدات مستقلة، وفى واقع الأمر ، فقد وضع مندل أصول مفهوم "الجين"، على الرغم من أن هذا المصطلح لم يستخدم إلا فى أوائل عام ١٩٠٠، وقد توصل مندل من التجارب أيضاً إلى أن كل فرد يحمل نسختين من كل صفة ، لكنه لا يورث إلا نسخة واحدة لكل ذرية، والأكثر من ذلك، فإن بعض الصور الأخرى من صفة معينة تكون صفات سائدة على الصفات الأخرى، فإذا ورثنا معاً ، تظهر الصفة السائدة بينما لا تظهر الصفة الأخرى المتنحية .

أوضحت هذه الفروض بشكل كامل الأنماط الوراثية في نبات البازلاء، وعلى سبيل المثال، فقد كانت للنباتات ذات البذور الملساء الأصلية وحدتان تحددان صفة "أملس" وكانت للنباتات ذات البذور المجعدة وحدتان تحددان صفة "المجعد"، بعد ذلك ورثت ذرية التزاوج الأول صفة من كل منهما، ونتيجة أن كل نباتات البازلاء كانت ملساء، تعنى أن هذه الصفة كانت سائدة على الصفة المتنحية. وعلى الرغم من ذلك، فإن الوحدة التي تحدد صفة التجعد لم تفقد، بل ظلت كامنة، ويمكن أن تظهر مرة أخرى في ذرية التزاوج الثاني، عندما تزوج معاً وحدتي الوراثة اللتان تحملان صفة مجعد. في عام ١٨٦٥ أنشر مندل نتائج أبحاثه في مجلة "جمعية برنو للعلوم الطبيعية"، لكنها ظلت محتجبة لفترة طويلة، وحتى داروين نفسه لم يتعرف عليها، على الرغم من أنها كانت منصبة بشكل مباشر في صميم أبحاثه، وتعتبر وحدات الوراثة التي وصفها مندل المادة الخام للتغير الذي يتأثر بالاختيار الطبيعي، وفي النهاية أعاد هوجو دي فريز **Hugo de Varies** وكارل كورنز **Carl Correns** اكتشاف أبحاث مندل في أوائل هذا القرن، حيث كانا يقومان بتجارب تربية مماثلة، وفي تلك الفترة تقريباً، أصبحت تعرف وحدة الوراثة الأساسية بالجين، وأصبح علم الوراثة (**Heredity**) يعرف بـ "genetics".

التعرف على أن الـ د.ن.أ هو مادة الوراثة

The identification of the genetic material as DNA

على الرغم من أن مندل وصف السلوك الأساسي للجينات، إلا أن تجاربه لم تكشف عن الطبيعة الكيميائية لوحدات الوراثة، ولم يحدث ذلك إلا في أواسط هذا القرن، غير أن الموقع المحتمل للجينات أصبح معروفاً قبل ذلك بفترة طويلة .

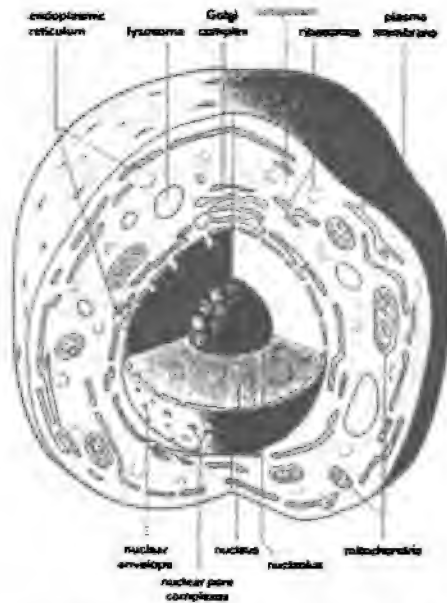
ففي ثلاثينات القرن الماضي، أدرك كل من ثيودور شفان^٢ وماتياس شلاين^٣ بصورة مستقلة ، أن جميع الكائنات الحية تتكون من خلايا؛ فالبكتيريا التي تعتبر من أصغر وأكثر الكائنات العضوية بدائية، لا تحتوي إلا على خلية واحدة، بينما تحتوي كائنات عضوية بالغة التعقيد كالإنسان على مليارات الخلايا.

وعندما اكتشفت الخلايا لأول مرة بواسطة أجهزة ميكروسكوب بدائية، ظهرت في صورة أكياس بسيطة مملوءة بسائل، ولما تطورت الميكروسكوبات، أدرك العلماء أن للخلايا تركيبات داخلية معقدة (شكل ١-٣)، والسمة البارزة في هذه التركيبات هي النواة، وجميع خلايا الكائنات العضوية الراقية الأخرى، التي تشمل النباتات والحيوانات، وحتى بعض الكائنات البسيطة جداً، كالخميرة والأميبا تحتوي على نوى ، وخلية نبات أو حيوان مثالية يصل قطرها حوالى ٢٠ ميكرومتراً (الميكرومتر هو جزء من ألف جزء من المليمتر)، ويبلغ قطر

٢ - ثيودور شفان (١٨١٠-١٨٨٢): عالم فيسيولوجي ألماني. يعتبر أحد مؤسسي علم الخلايا. (المترجم.)

٣ - إنشءاء علم - ماتياس جاكوب شلاين (١٨٠٤-١٨٨١): عالم نبات ألماني. أسهم إسهاماً بارزاً في الخلايا. (المترجم.)

النواة نفسها حوالى خمسة ميكرومترات، وتسمى الكائنات العضوية التى تحتوى خلاياها على نوى بالخلايا سوية النواة Eukaryotes، والخلايا الوحيدة التى لا يوجد بها نوى هى خلايا البكتيريا وبعض أشكال الطحالب البدائية، ويبلغ قطر بكثير نموذجى قضيبى الشكل حوالى ٠,٥ ميكرومتر، ويصل طوله بضعة ميكرومترات، حيث يعتبر إلى حد ما أصغر من النواة، وتسمى الكائنات العضوية التى لا توجد بخلاياها نوى بالخلايا بدائية النواة prokaryotes .



شكل (٣-١) مخطط لخلاية حيوانية "تمونجية"، يوضح تركيبها الداخلى المعقد، والسمة الداخلية الواضحة تماماً هى النواة، التى تحتوى على المادة الوراثية، ويلاحظ فى النواة أيضاً واحداً أو أكثر من التركيبات المسماة بالنيوكليول (جمع نوية)، حيث يخلق السرن أ. الريبوسومى، ويتحد مع البروتينات الريبوسومية، وتحاط النواة بغلاف غشوى ذى مسام يسمح بمرور جزيئات كبيرة بين النواة والسيتوبلازم، والجسيمات الريبوسية، وهى مواقع تخليق البروتين، إما أن تكون حرة فى السيتوبلازم، أو مرتبطة بأغشية الشبكة الهيولية الباطنة، وتنقل البروتينات المخلفة حديثاً فى صورة حويصلات من الشبكة الهيولية الباطنة إلى مجمع جولى، الذى يظهر فى الصور الميكروسكوبية الإلكترونية فى شكل كومة من الأقراص المسطحة، ويطراً على مجمع جولى سلسلة من تلسعات الإتضاع، مثل إضافة السكريات.

ويفرغم من حدوث بعض التفاعلات المنتجة للطاقة فى السيتوبلازم، إلا أن معظم طاقة الخلية تنأت من التفاعلات التى تحدث فى الميتوكوندريا، والتى تسمى أحياناً بمخازن طاقة الخلية. وتحتوى الجسيمات الحرة على الإنزيمات التى تحلل (تهدم) الأتفاض الخلوية والجزيئات الكبيرة، مثل البروتينات، التى أدخلت الخلية، ويحيط بالخلية الغشاء البلازمى، الذى يساعد على الحفظ على البيئة الطبيعية الداخلية عن طريق الاحتفاظ بالمواد الغذائية المطلوبة، واستبعاد النفايات، ولا يظهر بالمخطط الخيوط البروتينية والأنيوبية العديدة التى تحتاجها الخلية لكى تتحرك. ولكى تحفظ بشكلها.

تحتوى النوى على مادة تسمى صبغين 'chromatin'، لأنها تصبح سريعة الانصباع عندما تصبغ الخلايا بصبغات معينة، وينتظم الصبغين فى صورة أشكال شبيهة بالخيط تسمى صبغيات (كروموسومات) chromosomes، ويكون عددها المضبوط ثابتاً فى جميع أفراد أى نوع من الكائنات، وتظهر الكروموسومات فى صورة أزواج فى كل خلية من الخلايا سليمة النواة ، ما عدا الخلايا الجرثومية التى تتكون من بويضة وحيوان منوى، وتحتوى خلايا الإنسان على ثلاثة وعشرين زوجاً من الكروموسومات، أو ما مجموعه ستة وأربعون كروموسوماً ، بينما لا تحتوى خلايا ذبابة الفاكهة المستخدمة فى التجارب المعملية إلا على أربعة أزواج فقط من الكروموسومات.

وعندما تنقسم معظم الخلايا أثناء عملية تسمى بالانقسام الفتيلي mitosis، فإن الكروموسومات تتضاعف أولاً وبعد ذلك تنقسم بحيث تتلقى كل من الخليتين الوليدتين مجموعة كاملة من الكروموسومات المزدوجة، وهى الستة والأربعون كروموسوماً فى حالة الخلية البشرية، فى حين تجرى انقسامات الخلية التى تنتج الخلايا الجرثومية بطريقة ما بحيث تستقبل كل بويضة أو حيوان منوى

وبمجرد أن أعيد اكتشاف أبحاث مندل، أصبح من السهل ملاحظة أن سلوك الكروموسومات يتطابق مع سلوك وحدات الوراثة لمندل، فقد اقترح أن أى كائن عضوى يحمل وحدتين من كل صفة معينة، وتبعاً لذلك تحتوى خلايا الجسم الطبيعى دائماً على نسختين من كل كروموسوم، وعلاوة على ذلك، تتضمن نظرية مندل على أن كل من الأب والأم ينقلان وحدة واحدة فقط من الوحدات للمزدوجة من كل صفة، لابنته أو ابنه ، وتحتوى الخلايا الجرثومية على كروموسوم واحد من كل زوج كروموسومى.

- وعلى الرغم من التثبت من أن الكروموسومات هى الموقع المحتمل لمادة الوراثة، فلم يكن معروفاً سوى النذر اليسير عن الطبيعة الكيميائية للجينات أو تكاد تكون غير معروفة بالمرة، ولا كيف يمكن أن تترجم المعلومات التى تحتوى عليها إلى سمة ملحوظة، مثل لون بذرة البازلاء.

اكتشاف الـ د.ن.أ

The discovery of DNA

تتكون الكروموسومات غالباً من بروتينات وأحماض نووية، والتى قام باكتشافها فردريك ميسشر **Friedrich Miescher** فى ستينات القرن الماضى، الذى عزل المادة من نوى الخلايا، ويبدو أن البروتينات وهى أحد نوعى المادة البيولوجية المادة الأكثر احتمالاً لأن تكون مادة الوراثة، ذلك الاعتقاد الذى ظل سائداً حتى عام ١٩٥٠ ، وبعد ذلك الحين أصبح غير مقبولا،

ولم تحظ الأحماض النووية **Nucleic acids** بأهمية كبيرة ، ويرجع السبب فى ذلك إلى الاعتقاد بأنها كانت من الصغر وبساطة التركيب بحيث لا يمكنها أن

تُشفّر عن المعلومات الوراثية؛ فالحمض النووي يتكون من وصل وحدات بنائية ببعضها البعض، تسمى نكليوتيدات nucleotides (نوويّات)، ويتكون النكليوتيد من سكر يرتبط به مجموعة فوسفات، وقاعدة من القواعد الأربع، ويعتبر السكر بالنسبة للأحماض النووية الكروموسومية ريبوزاً منقوص الأكسجين، ومن ثم جاءت تسمية الحامض بالحامض النووي الريبى المنقوص الأكسجين (DNA)، والقواعد الأربع هي: الأدينين adenine، والثيامين thymine، والسيتوسين cytosine، والجوانين guanosine (شكل ١-٤).

وأما موضوع الحجم فقد حل بنفسه تماماً، عندما أدرك المتخصصون فى البيولوجيا الجزيئية، أن الأوزان الجزيئية المنخفضة ظاهرياً، التى تم اكتشافها فى عينات الـ د.ن.أ الأولى قد نتجت كذلك لأن المادة تتحلل أثناء عزلها، وفى الواقع، فإن جزيئات الـ د.ن.أ الخلوية، تعتبر جزيئات كبيرة جداً، ولها أوزان جزيئية molecular weights تصل إلى الملايين أو حتى مليارات. وبالرغم من وضوح هذه الحقيقة، إلا أن هناك اعتقاداً خاطئاً آخر ظل يعمل ضد احتمال أن تكون الجينات مصنوعة من الـ د.ن.أ. واعتقد علماء الكيمياء الحيوية بصفة عامة، أن جزيئات الحمض النووي الكبيرة، كانت تتكون ببساطة من تكرار تسلسل النكليوتيدات الأربعة ذاته المرة تلو المرة، ومن الصعب أن يحمل جزيء له هذا التركيب الثابت الرتيب معلومات يتطلبها صنع فأر أو إنسان.

وفى مقابل ذلك، فللبروتينات أشكال غاية فى التعقيد، وهى أيضاً جزيئات كبيرة، ولها أوزان جزيئية تصل من عشرات إلى مئات الآلاف، وأيضاً من ترابط وحدات بنائية بسيطة معاً، وهى فى هذه الحالة الأحماض الأمينية amino

acids. وتحتوى البروتينات على عشرين حمضاً أمينياً مختلفاً فى مقابل الوحدات البنائية النكليوتيدية الأربعة المكونة للـ د.ن.أ، ويلاحظ أن تركيب البروتينات المختلفة يمكن أن يكون متنوعاً.

وعلاوة على ذلك، تلعب البروتينات دوراً ديناميكياً مهماً فى حياة الخلية، فهى المكونات البنائية الرئيسة للأجزاء العديدة من التركيب الخلوى الداخلى للكائنات، وبالإضافة إلى ذلك، فهى تعتبر إنزيمات **enzymes**، تلك الحافزات البيولوجية التى تقوم بإجراء العديد من التفاعلات الكيميائية، التى تحصل من خلالها الخلية على النمو والطاقة. فى فترة الأربعينات، وجد الباحثون أن الجينات تقوم بعملية توجيه تخليق البروتينات، ومن بين المشاركين الرئيسين فى هذا البحث، جورج بيدل **George Beadle** وإوارد تاتوم **Edward Tatum**، اللذان تضمنت أبحاثهما فى الغالب كائنات عضوية بسيطة، مثل ذباب الفاكهة، والفطر والبكتيريا.

والطفرات **Mutations**، هى تغيرات فى الجينات، تؤدى إلى تغيير خصائص الكائن العضوى بشكل واضح، فقد تغير الطفرة لون عين ذبابة الفاكهة، على سبيل المثال، وقد تغير الطفرات أيضاً من المتطلبات الغذائية لكائن عضوى، إذ تجعله يعتمد على نوع معين من الغذاء لم يكن يحتاجه الكائن العضوى الأب، وعلى أية حال، فقد أوضح بيدل **George Beadle** وتاتوم **Edward Tatum** أن الطفرات الفردية فى بعض البكتيريا والفطريات، ترتبط بفقد إنزيمات معينة من كائنات الاختبار العضوية .

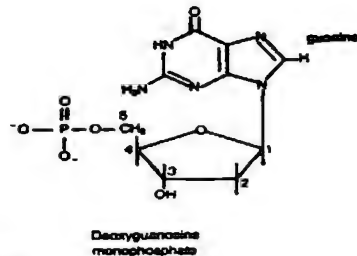
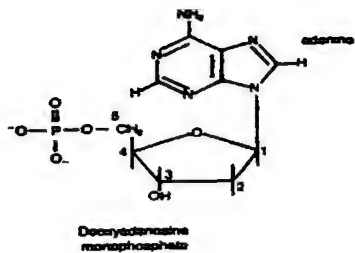
وجاء لينوس بولينج^٥ Linus Pauling (١٩٠١-) بدليل آخر على أن الجينات توجه عملية تخليق البروتينات، وهو الذى حدد العيب الجزيئى الذى يسبب أنيميا الخلية المنجلية sickle cell anaemia، ذلك المرض الوراثى البشرى، الذى تظهر فيه خلايا الدم الحمراء هشة جدا وعرضة للتلف، وتحتوى خلايا الدم الحمراء على بروتين الهيموجلوبين الذى يمكنها من نقل الأكسجين إلى أنسجة الجسم، وقد أوضح بولنج وزملاؤه أن الهيموجلوبين فى مرضى أنيميا الخلية المنجلية، يختلف من حيث التركيب عن هيموجلوبين الأفراد العاديين ، وبمعنى آخر، أن الجين الطافر الذى يسبب أنيميا الخلية المنجلية، هو الذى يوجه تخليق بروتين متغير.

وأنارت هذه النتائج سؤالا فلسفياً مهماً: إذا كانت الجينات توجه تخليق البروتين، فهل من الممكن أن تكون هى نفسها بروتينات؟ بيد أنه فى منتصف الأربعينات، بدأت الأبحاث تستبعد فكرة أن تكون البروتينات هى المادة الوراثية genetic material وبدأت تتجه نحو الـ د.ن.أ. وجاءت أحد الأدلة المهمة المقنعة عن طريق أوزوالد أفري Oswald Avery، وكولين ماكليود Colin MaLeod وماكلين ماكارتى Maclyn McCarty، الذين كانوا يعملون باحثين فى معهد روكفلر بمدينة نيويورك Rockefeller Institute، (ويسمى المعهد حالياً بجامعة روكفلر Rockefeller University).

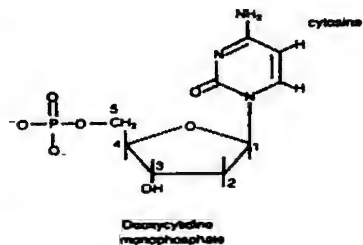
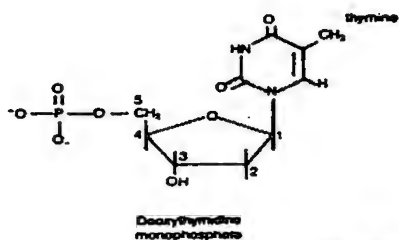
وقد وضعت دراسات فرد جريفيث Fred Griffith الأساس الذى بنوا عليه أبحاثهم، وهى التى أجراها فى فترة العشرينات عن بكتيريا ستربتوكوكس

٥- لينوس بولينج (كارل) (١٩٠١-): كيميائى أمريكى، ولد فى بورتلاند، وقد قام بتطبيق نظرية الكم على الكيمياء، وحصل على جائزة نوبل فى الكيمياء عام ١٩٥٤، لإسهاماته فى نظرية التكافؤ، وحصل على جائزة نوبل فى السلام عام ١٩٦٢، ويعتبر الشخص الوحيد الذى حصل على جائزتي نوبل كاملتين.

بنيومونيا (*Streptococcus pneumoniae*) ، التى تسبب مرض التهاب الرئة pneumonia فى البشر، وشديدة الفتك بالفئران، وإحدى الصور شديدة الخطورة لهذه البكتيريا، إنتاج مستعمرات خشنة الأسطح عندما تنمو على أطباق المزرعة، والصورة الأخرى التى لا تسبب التهاب الرئة، تنتج مستعمرات ناعمة الأسطح. واكتشف جريفيث أن الفئران التى حقنت بمزيج من بكتيريا المستعمرة الخشنة الميتة وبكتيريا مستعمرة ناعمة حية، قد مرضت على الرغم من أن البكتيريا الميتة لا تسبب المرض عندما تحقن بمفردها، وجاءت النتيجة، أن بعض عناصر بكتيريا المستعمرة الخشنة قد انتقلت إلى بكتيريا المستعمرة الناعمة، وبذلك جعلتها بكتيريا خبيثة، وقد فسر أفرى و ماكلويد وماكارتي أن هذا المركب، هو الـ د.ن.أ . وهذا الاكتشاف بأن الـ د.ن.أ يمكنه أن ينقل معلومات وراثية بين الأنواع البكتيرية، أصبح يعرف بمفاجأة أفرى المذهلة ، بسبب تأثيره المدوى الذى أثر به فى ذلك الحين على علم الأجنة فى البيولوجيا الجزيئية.

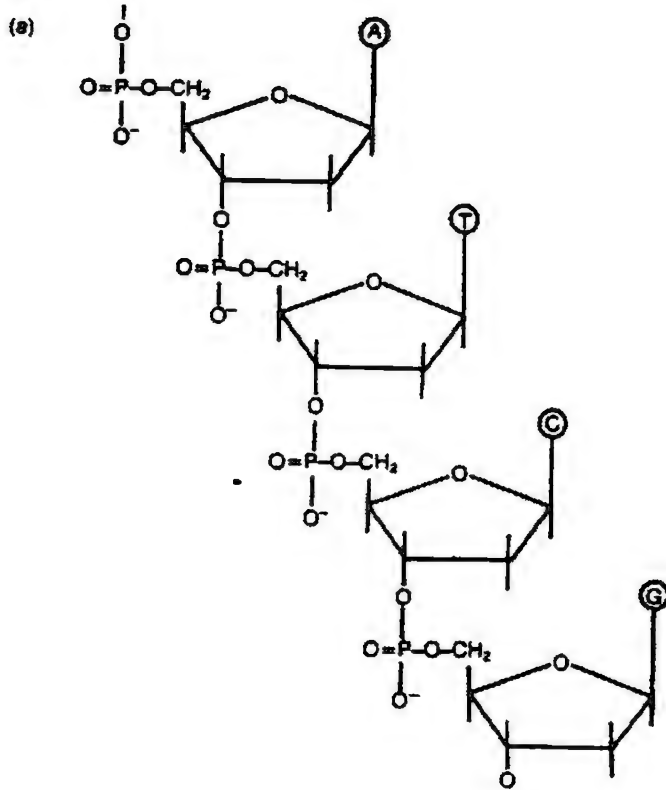


Purine nucleotides



Pyrimidine nucleotides

شكل ١-٤ وحدات البناء النكليوتيدية للـ د.ن. أ. يتكون كل نكليوتيد من مركب سكر وهو هنا منقوص الأكسجين (الذي يظهر في صورة حلقة ذات ثroat كربون مرفقة من واحد إلى خمسة)، و له مجموعة فوسفات (ذرة فوسفور مرتبط بها أربع ذرات أكسجين) مرتبط به بذرة الكربون رقم ٥. بقاعدة تحتوي على النتروجين ترتبط بذرة الكربون رقم ١. وتشمل القواعد الأربع الموجودة في د.ن. أ على قاعدتين بورين (اليتين وجوتين)، وعلى قاعدتين بيريميدين (ثيمين وسيتوسين). والوحدات البنائية النكليوتيدية لأحمض رن. أ لها وحدات بنائية مماثلة فيما عدا أن السكر يكون ريبوز، ولها مجموعة هيدروكسيل (-OH) على ذرة الكربون رقم ٢، ويستبدل الثيمين بـ يوراسيل، وهي قاعدة بيريميدينية أخرى.



شكل (١ - ٥ - ١) تركيب الـ د.ن. أ. تتكون جزيئات الـ د.ن. أ. من ربط الأكسجين الموجود في مجموعة الفوسفات في أحد النكليوتيدات بذرة الكربون رقم ٣ الموجودة بـ الذي أكسى ريبوز في النكليوتيد التالي في السلسلة (١). وهذا ينتج جزيء يتكون من عمود فقري ذي مجموعة فوسفات مع مجموعات دي أكسى ريبوزات متبادلة مع قواعد بارزة، وعلى الرغم من أن المخطط البياني يوضح د.ن. أ. يحتوي فقط على أربع نكليوتيدات، فيمكن أن تحتوي سلاسل الـ د.ن. أ. المكونة من الجينات على مئات النكليوتيدات، وتتكون جزيئات الـ د.ن. أ. بطريقة معقدة.



شكل (١-٥ ب) ويظهر في جزء السـ د.ن.أ الكامل سلسلتان متصلتان معا تكونان حلزوناً مزدوجاً، يظهر شكله الممتد الذي على صورة حرف B في المخطط (ب). والصود الفكري المكون من القوسات-دي أمسي ريبوز لكل سلسلة يظهر من الخارج، وتوجد القواعد في الداخل من الحلزون المزدوج، وتتزوج قواعد السلسلة الأولى مع قواعد السلسلة الأخرى تبعاً لقواعد شار جاف: ترتبط قواعد الأدينين دائماً مع قواعد الثيامين، وقواعد الجوانين مع قواعد السيوسين. ومن خلال مظهر السـ د.ن.أ هذا، يرى أن معظم القواعد أفضلية.

وبعد ذلك، لاحظ أروين شارجاف Erwin Chargaff في أوائل الخمسينات، بعض أوجه الانتظام في تكوينات القواعد التي تتركب منها جزيئات السـ د.ن.أ من أنواع مختلفة، والتي أعطت المدخل الأساسي لحل لغز تركيب المادة، وعلى وجه الخصوص، كانت نسبة الأدينين دائماً تساوي نسبة الثيامين، وكانت نسبة

الجوانين دائماً تساوى نسبة السيٲوسين، وعلى الرغم من ذلك ، فقد كانت تتفاوت نسبة زوج الأدينين-ثيامين لزوج الجوانين-سيٲوسين تفاوتاً كبيراً من نوع لآخر. وقد دحضت هذه الملاحظة الأخيرة فرضية أن الـ د.ن.أ يتكون من وحدة متكررة رتيبة من نكليوتيدات أربع، وإذا كانت هذه الفرضية صحيحة، فيجب أن تكون القواعد الأربع وهي الأدينين والسيٲوسين والجوانين والثيامين موجودة بكميات متساوية، غير أن هذا كان من الواضح مخالفاً لما اكتشفه شارجاف . واقترح البحث أن تركيب الـ د.ن.أ قد يكون له رغم كل شيء، التنوع المطلوب لأن يكون مستودع للمعلومات الوراثية. وفي أوائل الخمسينات أيضاً، فإن جيمس واتسون James D. Watson وفرنسيس كريك Francis Crick اللذين كانا يعملان معاً في ذلك الحين في معمل مجلس الأبحاث الطبية للبيولوجيا الجزيئية Medical Research Council's Laboratory of Molecular Biology في كمبردج بإنجلترا، يحاولان حل تركيب جزيء الـ د.ن.أ الثلاثي الأبعاد بواسطة طرق التصوير البلوري بالأشعة السينية X-ray crystallographic methods.

وفي التصوير البلوري بالأشعة السينية، تسقط حزمة من أشعة أكس على بلورة نقية من المادة الجاري دراستها، وتفرق البلورة أو تشتت الأشعة السينية بطريقة ما تتوقف على التركيب الثلاثي الأبعاد للجزيء، ويمكن تسجيل نمط الأشعة السينية المنفرقة على فيلم تصويري، ومنه يمكن إعادة إنشاء تركيب الـ د.ن.أ، بطرق رياضية معقدة.

وقد خاض واطسون وكريك تجربة أو تجربتين فاشلتين خلال جهودهما لاستنتاج تركيب الـ د.ن.أ، قبل أن تقدم لهما صورة الأشعة السينية المفارقة، التى ابتكرها روسالند فرانكلين Rosalind Franklin فى معمل موريس ويلكنز Maurice Wilkins' laboratory بكمبردج خدمة جليلة، وباستخدام المعلومات المحتواة فى الصورة المفارقة، والاستعانة بقواعد شارجاف، استطاع واطسون وكريك التوصل إلى أن جزيء الـ د.ن.أ يتكون من سلسلتين مستقلتين من النكليوتيدات الملفوفة حول بعضها فى صورة حلزون مزدوج (شكل ١-٥)، وتتكون كل سلسلة من عمود فقرى تتبادل عليه نكليوتيدات الفوسفاتات والريبوزات المنقوصة الأكسجين، وتبرز القواعد من العمود الفقرى. ويقع العمودان الفقريان للسلسلتين جهة الخارج فى حلزون واطسون-كريك المزدوج، بينما تقع القواعد داخل العمودين الفقريين. وتكون قواعد إحدى السلسلتين روابط هيدروجينية ضعيفة مع قواعد السلسلة الأخرى بطريقة محددة تماماً، وتبعاً لقوانين شارجاف، ترتبط قواعد الأنين على الدوام بقواعد الثيامين، وترتبط قواعد السيتوسين على الدوام بقواعد الجوانين.

ويقدم التصميم الجزيئى للـ د.ن.أ وسيلة للاحتفاظ بالمعلومات الوراثية ونقلها للأجيال القادمة، وتعد الجزيئات من الكبر بحيث يمكنها أن تسفر عن قدر كبير من المعلومات فى تسلسلها النكليوتيدية، وعلاوة على ذلك، يمكن التعرف على التسلسل النكليوتيدى لإحدى السلسلتين عن طريق التسلسل الآخر.

وقبل أن تنقسم خلية، يجب أن تتضاعف مادتها الوراثية، بحيث ترث كل خلية وليدة نسخة مضبوطة وكاملة، ولكى يتضاعف الـ د.ن.أ حينئذ، فإن الجديلتين تنفصلان، وتعمل كل واحدة منهما كنموذج أو نمط لتخليق

أخرى (شكل ١-٦). ووفقاً لقوانين الازدواج القاعدي، فإن قواعد الأثنين ترتبط مع قواعد الثيامين، وترتبط قواعد الجوانين مع قواعد السيتوسين، بحيث ينتج جزيئى الجديلة المزدوجة، اللذين كلاً منهما نسخة مطابقة من تركيب الـ د.ن.أ. الأصلي، وترث كل خلية وليدة إحدى النسختين.

وقد يبدو من النظرة الأولى، إن هناك مشكلة كبيرة فى فكرة أن يكون الـ د.ن.أ. هو المادة الوراثية، فالـ د.ن.أ. ليس له سوى أربع قواعد بنائية، غير أنه يجب أن يوجه تخليق البروتينات، التى تتكون من عشرين حمضاً أمينياً مختلفاً، ومع ذلك، فلا يعتبر هذا مشكلة فى الحقيقة، لأن كل مجموعة مكونة من ثلاث نكليوتيدات تحدد حمضاً أمينياً معيناً، ويمكن أن تعطى أربعة نكليوتيدات ٦٤ مجموعة (مضروب الرقم ٤)، عندما تجمع فى صورة ثلاثيات ٣٤ = ٦٤ مجموعة، وهى أكثر من اللازم لتحديد عشرين حمضاً أمينياً.

وفى فترة الستينات، أجريت دراسة مستفيضة على الشفرة الوراثية genetic code، من خلال الجهود التى قام بها كل من هار كوبند خورانا Har Kobind Khorana، ومارشال نيرنبرج Marshall Nirenberg، وسيفيرو أوشوا Severo Ochoa، اللذين أوجدوا طرقاً لتحديد أى تسلسل ثلاثى نكليوتيدى أو كودون - كما جرى العرف على تسمية التسلسلات - يناظر أى حمض أمينى، واتضح لهم أن معظم الأحماض الأمينية يمكن أن تمثل بأكثر من كودون واحد، وجميع

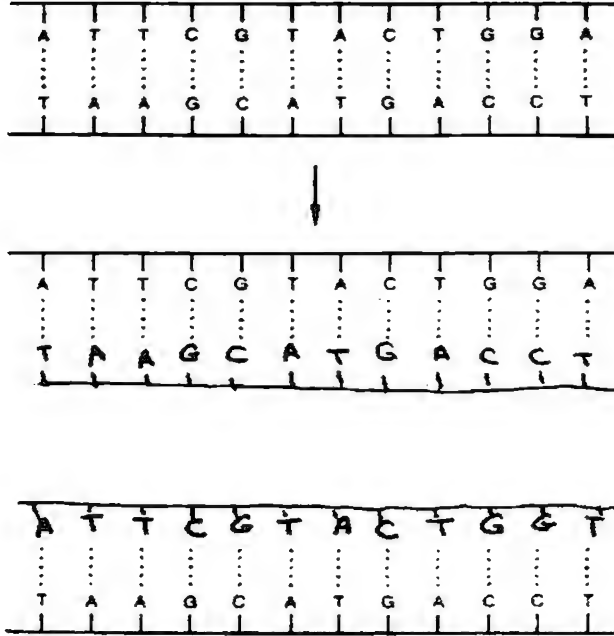
سهلة، ولكن العكس ليس صحيحاً. فالحمض الأميني Leucine، على سبيل المثال، يمكن أن يمثل في جين بأى كودون من ستة كودونات مختلفة. وتعمل الكودونات غير المستخدمة في تحديد الأحماض الأمينية كإشارات توقيف stop signals ، فهي تحدد نهاية الجينات، مثل النقطة التي تحدد نهاية الجملة؛ وعلى ذلك، فإن الجين عبارة عن تسلسل طولى من كودونات تحوى كل منها على ثلاث نكليوتيدات ، يحدد كل منها حمضاً أمينياً معيناً، أو يعمل فى النهاية كإشارة توقيف.

جدول ١ - ١ الشفرة الوراثية

The Genetic Code

الوضع الثالث	الوضع الثاني				الوضع الأول
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trap	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Cys	Gly	A
	Val	Ala	Cys	Gly	G
	(Met)				

ينطلب تكوين كودون حمض نووي لتحديد حمض أميني واحد ، تسلماً من ثلاث نكليوتيدات ، ويمكن أن تغطي أربع نكليوتيدات ، ٦٤ مجموعة مختلفة من ثلاثيات النكليوتيد ، وتستخدم جميعها في الشفرة الوراثية ، وبناء عليه ، فإن كل الأحماض الأمينية فيما عدا حمض ميثيونين (Met) وحمض تربتوفان (Trp) ، يمكن أن تحدد بأكثر من كودون واحد ، بقرغم من أن المجموعة GUG ، التي تحدد عادة حمض الفالين (Val) تحدد في ظل ظروف معينة حمض الميثيونين بدلاً منه . ولا تمفر كودونات التوقيف ، UAA ، UAG و UGA عن أحماض أمينية ، لكنها تعتبر إشارة نهاية البروتين . وظهرت الكودونات كما تظهر في ر.ن.أ الرسول ، فالقواعد الأربع في نكليوتيدات الأحماض النووية الربيبية هي : ليوراسيل (U) ، والسيتوسين (C) ، والأدينوسين (A) والجوانين (G) ، والأحماض الأمينية التي تحدها الشفرة الوراثية هي : حمض الألانين (Alu) والأرجنتين (Arg) والأسبرجين (Asn) ، وحمض الأسبرتيك (Asp) ، والميسيتين (Cys) والجليسين (Gly) والحلوانامين (Gln) والجلوتاميك (Glu) والهيستيدين (His) والأيزوليوسين (He) والليوسين (Leu) والليسين (Lys) والميثيونين (Met) والفينالانين (Phe) والبرولين (Pro) والميرين (Ser) وفربونين (Thr) والتربتوفان (Trp) والتيروسين (Tyr) والفالين (Val) .



شكل ٦-١ نسخ الـ د.ن. أ .

عندما يتضاعف الـ د.ن.أ، فإن جدلتى الجزيء تتفصلان، وتصل كل منهما كنموذج لتخليق جديدة متممة جديدة، حيث يضمن التزاوج الإيجارى لقواعد الأنين مع قواعد الشلمين، وقواعد الجواتين مع قواعد السيوسين أن يصبح الجزيئان الوليدان نسخة مطابقة من النسخة الأصلية.

كيف يتحول التركيب الجينى إلى تركيب بروتينى؟

How gene structure is translated into protein structure?

تمتلك الخلايا آلية فى غاية الإتقان لتحويل تسلسلات الجينات النكليوتيدية إلى تركيبات بروتينية، وهذه الآلية مطلوبة لأنه لا يوجد للأحماض الأمينية انجذاباً كيميائياً للنكليوتيدات، الذى يمكن الأحماض الأمينية من التعرف على كودوناتها، وتصطف بالترتيب الذى يحدده الجين، ويجرى التغلب على هذه المشكلة بمساعدة الأحماض النووية الريبية .

ويتبع تركيب الـ ر.ن.أ الخطأ العامة نفس التى يتبعها تركيب الـ د.ن.أ، غير أن هناك اختلافات جوهريية بين نوعى الحمض النووى ر.ن.أ و د.ن.أ). فجزئيات الـ ر.ن.أ تعتبر كبيرة أيضاً وتتكون من ترابط لوحدات البنائية النكليوتيدية معاً، فيما عدا أن جزئيات الـ ر.ن.أ تحتوى على كسر ريبوز، بدلاً من الريبوز المنقوص الأكسجين، بالإضافة إلى ذلك، لا تحتوى الأحماض النووية الريبية على قاعدة الثيامين، لكنها تحتوى على قاعدة يورسيل فى المكان الذى يحتوى فيه الـ د.ن.أ على الثيامين، وأخيراً، قاعدة م تكون جزئيات الـ ر.ن.أ عبارة عن جديلة واحدة بدلاً من الجديلة لمزوجة لجزئى الـ د.ن.أ، إلا أنه فى بعض جزئيات الـ ر.ن.أ تتطوى لجنيلة الواحدة على نفسها، وبذلك تكون تركيبات لولبية.

وهناك ما لا يقل عن ثلاثة أنواع مختلفة من حمض الريبونوكليك (ر.ن.أ) تساهم فى تخليق البروتين، وعندما يصبح أحد الجينات نشطاً، فإن أول خطوة نحو إنتاج البروتين الذى يشفر عنه، هى نسخ الـ د.ن.أ إلى جزئى ر.ن.أ الرسول"، والذى سى بهذا الاسم، لأنه يحمل الرسالة المحددة للتركيب البروتينى إلى جزء الخلية الذى يتم فيه التخليق (شكل ١-٧). وفى البكتيريا وكذلك الخلايا ذات النوى، يتم هذا التخليق فى الجسيمات الصغيرة المعروفة بالجسيمات الريباسية ribosomes. وتتكون الجسيمات الريباسية من بروتينات، بالإضافة إلى نوع ثان من حمض الريبونوكليك (ر.ن.أ ريبوسومى) الذى يساهم فى تخليق البروتين، وتوجد الجسيمات الريباسية داخل سيتوبلازم الخلية cell cytoplasm، التى إما أن تكون أو مرتبطة بأغشية الشبكة الهيولىية

الباطنة **endoplasmic reticulum**، وهذا يعنى، أنه فى الخلايا ذات النوى، فإن على الـ ر.ن.أ الرسول أن يخرج من النواة ويدخل إلى السيتوبلازم.

وعندما يجرى تخليق ر.ن.أ رسول، فإن الجذيلة المزدوجة لـ د.ن.أ الجين يجب أن تتفصل جزئياً، لكى تكشف جزء من التسلسل النكليوتيدى، والنكليوتيدات الريبوزية التى سترتبط معاً لتشكل الـ ر.ن.أ الرسول تصطف على طول تسلسل الجين، تبعاً لقوانين الازدواج القاعدى المعروفة، فيما عدا أن كل قاعدة أدنين فى د.ن.أ ستردوج مع قاعدة يوراسيل فى الـ ر.ن.أ الجارى تخليقه، بدلاً من ارتباطها بقاعدة ثيامين، وعندما تصطف النكليوتيدات الريبوزية بالترتيب الصحيح، فإنها ترتبط ببعضها بواسطة إنزيم يسمى بـ ر.ن.أ بوليمراز **RNA polymerase**، الذى يتحرك على طول الجين إلى أن يتم نسخه بالكامل فى ر.ن.أ الرسول.

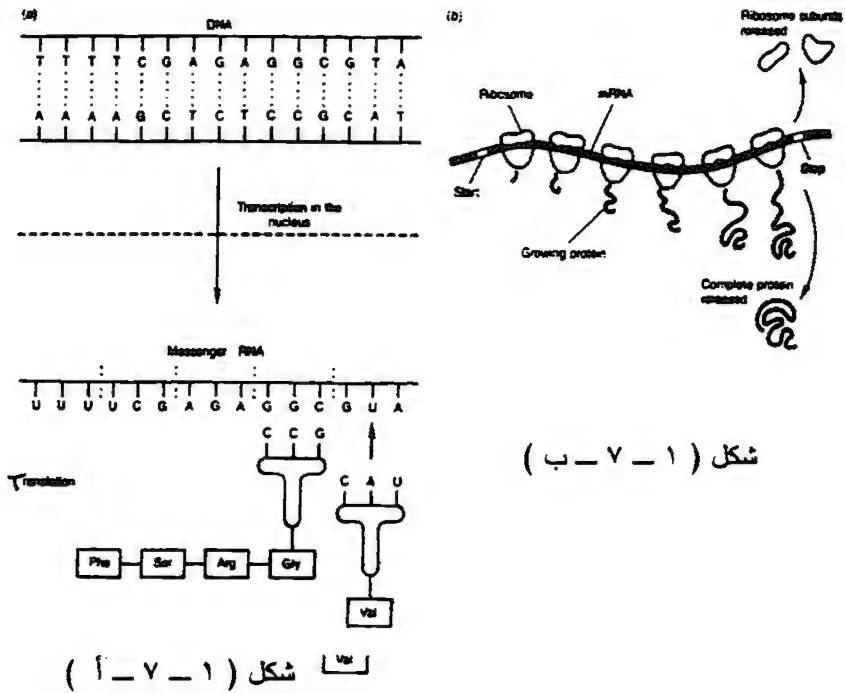
ويعرف تخليق الـ ر.ن.أ بأنه عملية النسخ الجينى **transcription**، والخطوة التالية، وهى التكوين الحقيقى للبروتين، تسمى بالتحويل **translation**، وعند هذه المرحلة، يظهر دور الـ ر.ن.أ الناقل (**transferRNA**)، وهو النوع الثالث من الـ ر.ن.أ، الذى يساهم فى تخليق البروتين، وتستخدم جزيئات الـ ر.ن.أ الناقل كعوامل معدلة، لصف الأحماض الأمينية لكى ترتبط بالترتيب الذى يحدده الجين ورسوله الـ ر.ن.أ. ويتعرف الـ ر.ن.أ الناقل على الكودون المناظر فى ر.ن.أ رسول بواسطة تسلسل متمم ذى ثلاث قواعد ("**anticodon**" an)، الذى يرتبط بالكودون تبعاً لقوانين الازدواج القاعدى **base-pairing rules**.

ولكل حمض أميني ر.ن.أ ناقل واحد على الأقل، ولل بعض منها أكثر من ناقل، وتصبح الأحماض الأمينية مرتبطة بجزيئات الـ ر.ن.أ الناقلة لها، التي تصطف حينئذ على ر.ن.أ الرسول بواسطة الأنتيكودونات المتعرفة، وبالتزاوج القاعدى مع الكوبون المناسب، وفى النهاية، ترتبط الأحماض الأمينية إنزيمياً، ويكتمل تخليق البروتين. ومع نهاية فترة الستينات، اكتمل المفهوم العام لعمل الجين بدرجة كبيرة، غير أن جميع الأبحاث الأساسية قد تمت بواسطة الجينات البكتيرية، وبنهاية فترة السبعينات قام علماء البيولوجيا الجزيئية باكتشاف مدهش لجينات الكائنات العضوية السليمة النواة.

وتمتد التسلسلات المشفرة للبروتين فى الجينات البكتيرية بصورة مستمرة من بداية الجين حتى نهايته، فى حين تتقاطع القطع المشفرة للبروتين فى غالبية جينات الخلايا الراقية سليمة النواة عن طريق تسلسلات نكليوتيدية لا تشفر عن تركيب البروتين، هذه المناطق غير المشفرة، والتي تسمى بالـ تسلسلات العائقة أو "introns"، يتم نسخها داخل جزيئات ر.ن.أ الناقلة للجينات، لكنها تفصل بعد ذلك، قبل أن يحولها الناقل إلى بروتين.

والفوائد التى تعود على الكائن العضوى سليم النواة بهذا النوع الأكثر تعقيداً من التنظيم الجينى، ليست معروفة بصورة كاملة، وأحد الاحتمالات التى تم التوصل إليها بالبرهان التجريبي، هو أن الجينات كانت تتجمع خلال مرحلة التطور عن طريق ضم تسلسلات د.ن.أ مستقلة، تشفر عن قطع بروتين ذات قدرات وظيفية مختلفة، وعلى ذلك، فربما تكون الانترونات "introns" بقايا العملية التى جمعت القطع الوظيفية المختلفة ببعضها. ولم تفسر الأبحاث الأولية عن تركيب الجين وتخليق البروتين الكثير من الكيفية التى يتم بها التحكم فى

الجينات، خصوصاً في خلايا الكائنات الراقية، ولم يبدأ علماء البيولوجيا الجزيئية في التعامل مع هذه المشكلة، إلا في السنوات القليلة الماضية، واعتبر هذا أيضاً جزءاً من الثورة التي بدأت في أوائل السبعينات باكتشاف تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم recombinant DNA technology.



شكل ٧-١ (أ) و (ب) تخليق البروتين . يتطلب تخليق البروتين انفصال جديلتى جزيء الـ د.ن.أ. لكي تسمح بنسخ إحدى الجديلتين في ر.ن.أ. الرسول ، وتم هذه العملية التي تعرف بـ النسخ الجيني داخل النواة التي يوجد بها الجينات ، و بعد ذلك ينتقل ر.ن.أ. الرسول من النواة إلى السيتوبلازم، حيث تتم عملية تخليق البروتين .

وفي تلك الأثناء، ترتبط بترسبات معينة كل حمض من الأحماض الأمينية بـ ر.ن.أ. النقل المناسب، ويكون ر.ن.أ. الرسول و ر.ن.أ. النقل للحمض الأميني الأول مركباً مع الجسيم الريبوسى، بعد ذلك ، يتحرك الجسيم الريبوسى بصورة نشطة على طول جزيء الـ ر.ن.أ. الرسول ، وتثناء حركته، يتعرف الأنتيكودون الموجود على ر.ن.أ. النقل لكل حمض أميني متملق على الكودون المناظر على الـ ر.ن.أ. الرسول ، ويضع الحمض الأميني في مكان لربطه بسلسلة البروتين المتنامية، وبهذه الطريقة، تنتقل المعلومات المشفرة في التسلسل الطولى للتكايوتيدات في داخل د.ن.أ. الجينات إلى التسلسل الطولى للأحماض الأمينية في بروتين.

الـ د.ن.أ.المطعم

Recombinant DNA

ترجع جذور التطورات التي بلغت ذروتها بتكنولوجيا الـ د.ن.أ. إلى أوائل السبعينات، يتكون الـ د.ن.أ. المطعم عن طريق وصل أو "تطعيم" بلغة البيولوجيا الجزيئية، جزيئات د.ن.أ. من مصادر مختلفة، وقد نشأت هذه إمكانية من خلال الأبحاث التي أجريت على أنزيمات القطع (restriction enzymes) التي تنتج داخل البكتيريا كجزء من وسائلها الدفاعية ضد جزيئات د.ن.أ. معادية غريبة، مثل جزيئات د.ن.أ. الفيروسات، وتقوم إنزيمات القطع بتمير الـ د.ن.أ. الغريب بتقطيعه إرباً، وفي نفس الوقت، يحمي د.ن.أ. البكتير العائل بواسطة تعديل كيميائي يمنع الإنزيمات من مهاجمته.

ولإنزيمات القطع اثنين من الخصائص تجعلها عظيمة الفائدة لعلماء البيولوجيا الجزيئية، أول هذه الخصائص هي تخصصها specificity، حيث يتعرف كل إنزيم على تسلسل نكليوتيدي واحد فقط داخل الـ د.ن.أ. ويقطعه، وقد تم تحديد بضع مئات من إنزيمات القطع ذات التخصصات النكليوتيدية المختلفة، ويمكن استخدام الإنزيمات من بين أشياء أخرى، في وصف خصائص الجينات.

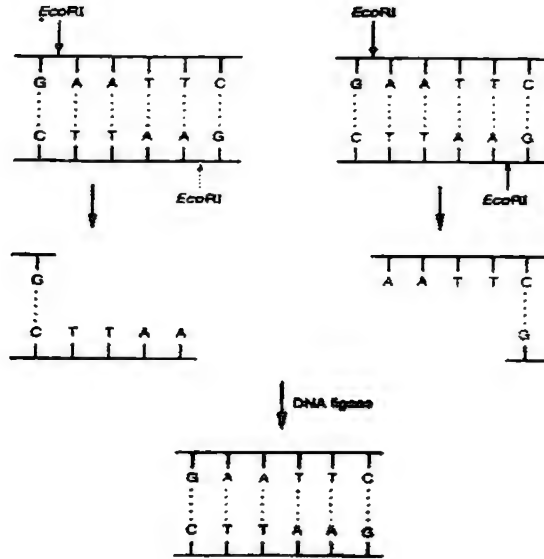
ويمكن مقارنة تركيب اثنين من الجينات عن طريق هضمهما بواسطة سلسلة من عدة إنزيمات قطع، فإذا كانت الجينات متماثلة، فسوف تنتج نفس نمط القطع بالضبط مع كل الإنزيمات، بيد أنه إذا تغيرت تسلسلاتها النكليوتيدية، فسوف تنتج أنماطاً مختلفة من أجزاء القطع، ويجرى استخدام خاصية التخصص

لإنزيمات القطع حالياً، كأساس للأساليب الجديدة فى تشخيص الأمراض الوراثية، مثل مرض أنيميا الخلية المنجلية، الذى تسببه تغييرات تركيبية فى الجينات (انظر الفصل الرابع عشر).

والخاصية الثانية لإنزيمات القطع، التى جعلت منها وسيلة مفيدة للغاية، هى قدرة العديد منها على إحداث قطوعات شطرنجية، عندما تشق جديلة الـ د.ن.أ. المزدوجة، والأجزاء (الشظيات) الناتجة بهذه الطريقة تكون جديلة مزدوجة، غير أن لها "أطراف لزجة" ذات جديلة مفردة، ويبرز من طرفى (الشظيات) أذيال ذات جديلة مفردة، لها تسلسلات قواعد، التى يمكنها التعرف وتتزوج قاعدياً مع بعضها البعض (شكل ٨-١). وعلى سبيل المثال، فالشظيات التى ينتجها الإنزيم المسمى بـ **EcoRI** لها تسلسلات وحيدة الجديلة "AATT" على أحد الأطراف و "TTAA" على الطرف الآخر، (تمثل A الأدينين و T الثيامين)، وعندما تتجمع الشظيات مع بعضها فى ظروف مناسبة، فإن أطرافها اللزجة ستتحّد مرة أخرى، بعد ذلك يمكن أن تتغلق الشظيات مرة أخرى بواسطة إنزيم يسمى (ligase)، يعمل على وصل الجذائل ببعضها البعض، وحتى شظيات الـ د.ن.أ. من مصدرين مختلفين يمكن وصلهما بهذه الطريقة، على شرط أن يكونا قد نتجا فى الأصل من نفس إنزيم القطع.

كانت مجموعة بول برج **Paul Berg's group** فى مدرسة الطب التابعة لجامعة ستانفورد فى بالو ألتو بكاليفورنيا، أول مجموعة تقوم بوصل جزيئات د.ن.أ. غريبة فى جزيء مطعم، حيث قاموا بوصل جينات من بكتيريا *E. coli* مع د.ن.أ. من فيروس قرادى ٤٠ (SV٤٠)، وفى ذلك الحين، لم يكن يدرك الباحثون بعد أن بعض إنزيمات القطع، بما فيها الإنزيم الذى كانوا يستخدمونه، يحدث أطرافاً لزجة، وقام باحثوا ستانفورد بصنع الأطراف

بأنفسهم، من خلال إضافة قواعد مناسبة لشظايا القطع ، ومن الأسهل جعل إنزيمات القطع تقوم بهذا العمل .



شكل ٨-١. توليد 'الأطراف اللزجة'. تقطع إنزيمات القطع عند تسلسلات نكليوتيدية معينة، وغالبا ما تنتج قطوعت شطرنجية ، تنتج 'أطرافاً لزجة' ذات جذبية واحدة، ومن بين إنزيمات القطع الشائعة الاستخدام ، على سبيل المثال لإنزيم EcoRI، الذي يقطع التسلسل الموضح في المواقع المبينة بالأسهم ، ونتيجة لذلك ، فإن الطرف ذا الجذبية الواحدة لأحدى القطع يمكنه التعرف والارتباط بطرف أي قطعة أخرى ينتجها نفس الإنزيم حتى لو كُتلت القطع في الأصل قد جاءت من أنواع د.ن.أ مختلفة، ويمكن للقطعتين أن يوصلا ببعضهما من خلال تأثير إنزيم يسمى د.ن.أ ليجاز ، وهذا الإجراء يشكل الأساس لتكنولوجيا د.ن.أ المطعم.

ومهدت إمكانية صنع جزيئات د.ن.أ مطعمة الطريق لعزل وإنتاج كميات غير محدودة من أي جين مطلوب ، ويمكن إدخال جزيئات د.ن.أ غريبة في د.ن.أ فيروسية، كما أوضح بيرج وزملاؤه ، والتي يمكن استخدامها كوسائل لإنتاج الجينات الغريبة في البكتيريا أو الخلايا المستزرعة الأخرى، وسوف تنتج بعد ذلك جزيئات الـ د.ن.أ المطعمة في الخلايا، وبذلك تولد كميات كبيرة من الجينات الغريبة.

ويمكن استخدام البلازميدات **plasmids** أيضاً فى إنتاج جينات غريبة (شكل ١-٩). فالبلازميدات هى عبارة عن جزيئات د.ن.أ حلقية، ذات جديلة مزدوجة، وتوجد بصورة طبيعية فى البكتيريا، حيث تتكاثر بصورة مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى.

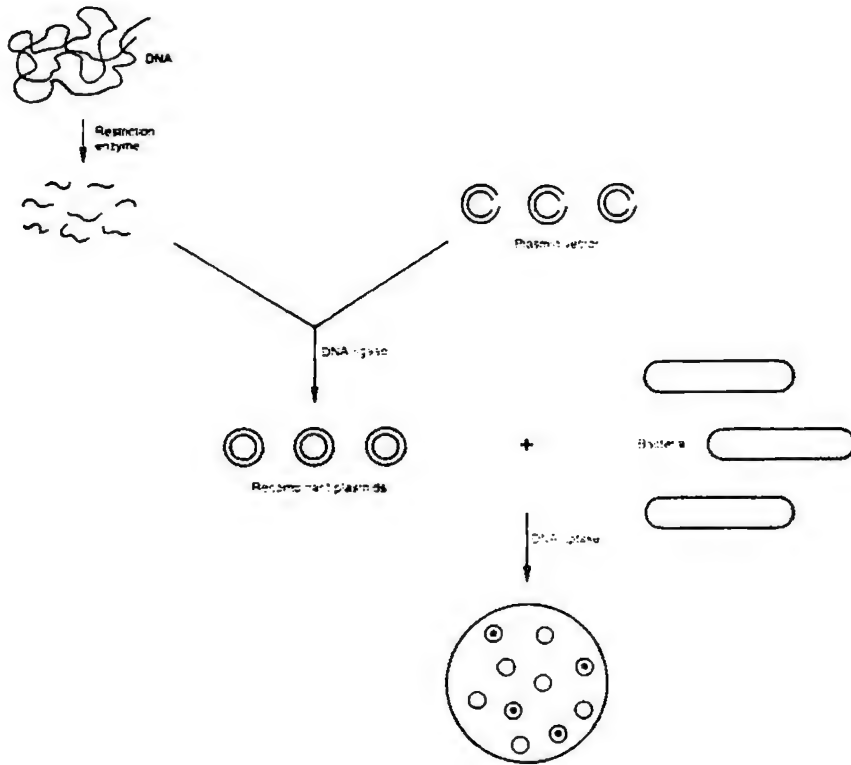
وكان البلازميد المسمى بـ **pSC١٠١**، أول بلازميد يطور كأداة لإدخال د.ن.أ غريب فى البكتيريا، حيث تم اكتشافه فى معمل ستانلى كوهين **Stanley Cohen's laboratory** فى مدرسة الطب بجامعة ستانفورد، وقد استطاع كوهين وأنى تشنج **Annie Chung** من ستانفورد أيضاً ومعهم هربرت بوير **Herbert Boyer** وروبرت هلينج **Robert Helling** من جامعة كاليفورنيا فى سان فرانسيسكو، أن يدخلوا جيناً غريباً فى البلازميد، وأثبتوا أنه لا يزال يتكاثر بطريقة طبيعية داخل البكتيريا.

ويسمى إكثار الجينات الغريبة فى الخلايا البكتيرية أو الخلايا الأخرى باستنساخ الجين **gene cloning**، وتشير كلمة استنساخ **Clone** إلى مجموعة كائنات سواء كانت نباتية، أو خلايا بكتيرية، أو جينات كما فى حالتنا هذه، وتعتبر جميعها نسخ طبق الأصل من فرد واحد. وكنتيجة لتطوير الـ د.ن.أ المطعم وتكنولوجيا استنساخ الجين، أصبح من الممكن إنتاج كميات كبيرة من جينات معينة، وتكمن صعوبة المشكلة فى تحديد الخلايا التى تصنع الجين الغريب المطلوب، غير أن علماء البيولوجيا الجزيئية استطاعوا استنباط عدة أساليب للقيام بذلك، والتى سوف تناقش بشكل مفصل فى (الفصل الرابع).

وباشترك تكنولوجيا استنساخ الجين مع التطورات الحديثة في طرق تحليل الـ د.ن.أ التي أمكن التوصل إليها، أصبح أكثر سهولة تحديد التسلسلات النكليوتيدية للجينات عن تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات، وينطبق هذا بصفة خاصة على البروتينات الموجودة في خلايا بتركيزات منخفضة، ويصبح من الصعب فصلها عن البروتينات الملوثة، وفي أغلب المرات ، كان ناسخو الجين، هم الذين قدموا أول تسلسلات حمض أميني كاملة للبروتينات المهمة، وبمجرد أن يصبح الجين المستنسخ متوفراً ، فالتسلسل النكليوتيدي، ومن ثم تسلسل الحمض الأميني المناظر له يمكن الحصول عليه في غضون أسابيع.

وتمثل هذه السهولة النسبية في الحصول على التسلسلات الجينية، تغييراً ملحوظاً في الموقف الذي كان سائداً عام ١٩٧٠، فتسلسل الجينات، ولاسيما للكائنات الراقية، كان يعتقد إلى حد بعيد في ذلك الحين أنه لا يمكن الحصول عليه، فقد كان من الصعب تحديد التسلسلات البروتينية، إلا إذا توفر الوقت الكافي، ووجدت عينة البروتين النقية التي سيجري عليها البحث، وكانت المشكلة القائمة، هي الحاجة إلى كمية كبيرة نسبياً من البروتين للحصول على تسلسل حمض أميني كامل، وكان يجري تخليق البروتينات المهمة بكميات ضئيلة، بيد أنه حتى إلى وقتنا هذا، فلا يزال يلعب الترتيب المتوالى المباشر للبروتين دوراً مهماً في البيولوجيا الجزيئية، ومع مقدم طرق أوتوماتية جديدة لتحليل تسلسل البروتين، مثل تلك الطريقة التي طورها ميشيل هانكاپلر **Michael Hunkapillar** وليروى هود **Leroy Hood** في معهد كاليفورنيا للتكنولوجيا في باسادينا، جعلت من الممكن على الأقل تحديد تسلسلات أحماض أمينية جزئياً من عينات صغيرة

جداً من البروتينات، فلا يتطلب من المادة أكثر من بضع ميكروجرامات (الميكروجرام، واحد من المليون من الجرام).



شكل ٩-١ استنساخ الجين. يقطع د.ن.أ من مصدر مرغوب بواسطة إنزيم قطع، مثل إنزيم EcoRI، ويتم إدخال القطع بطريق الد.ن.أ. المطعم في بلازميد أو متجه استنساخي آخر يولتي مستكثراً في خلايا عاقلة مناسبة، وفي الماضي، كقت الخلايا البكتيرية تستخدم في الأساس، بينما تستخدم حالياً خلايا الكفالت الراقية على نطاق واسع، ويعد إدخال البلازميدات المطعمة في عوائل مناسبة، تنمو الخلايا في المزرعة بحيث تصبح كل مستعمرة مكونة مستنسخاً يتكون من ذرية خلية واحدة.

وعادة ما يحتوي متجه الاستنساخ على جين يشفر عن إحدى الصفات المرغوبة مثل مقاومة المضادات الحيوية، وإذا ما حدث هذا فلا تنمو إلا الخلايا التي تكتسب البلازميد المطعم في وجود المضاد الحيوي، و أكبر مشكلة تواجه استنساخ الجين، هي تحديد المستنسخات التي تحمل الجين الذي يسعى الباحث إلى عزله، ويمكن القيام بذلك بعدة طرق مختلفة، ويمكن الكشف عن المنتج البروتيني بواسطة نشاطه، إذا كان له نشاطاً محسوساً، أو يمكن الكشف عنه بواسطة جسم مضاد أحادي الاستنساخ معين، وبمجرد أن يتم عزل الجين، فيمكن أن يصنع منه أو من منتجه كميات كبيرة في الخلايا العاقلة.

وغالباً ما يكون تسلسل حمض أميني جزيئياً، الأساس لاستنساخ الجينات أو بروتينات النادرة، ويمكن إنشاء المجسات التي تتكون من تسلسلات نكليوتيدية منظرة لتسلسل الحمض الأميني، واستخدامها في الكشف عن الجين المستنسخ لمرغوب، بالإضافة إلى ذلك، فإن البيبتيدات نفسها يمكن أن تخلق وتستخدم في صنع أجسام مضادة antibodies، التي ستفاعل مع البروتين السليم (انظر الفصل ثالث عشر). ولهذه الأجسام المضادة تطبيقات عديدة، تشمل الكشف على خلايا المهندسة وراثياً، التي تحتوي على الجين المستنسخ للبروتين الذي يتعرف عليه الجسم المضاد.

التحكم في تعبير الجين

The control of gene expression

وساعدت تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم بدرجة كبيرة أيضاً على حل مشكلة كبرى تتعلق بتخليق البروتين، والتي لم يكن من المستطاع تحديده بسهولة في الوقت الذي وضع فيه المخطط العام لبحث كيفية عمل الجينات، وتتعلق هذه المشكلة بالسؤال عن الشيء الذي يجعل جين معين نشطاً أو خامداً عندما يقوم بتوجيه تخليق بروتين يشفر عنه.

وكان الافتراض، هو أنه بعض المعلومات على الأقل المطلوبة لتنظيم تعبير الجين، ستشفر داخل الـ د.ن.أ. نفسه وقد لاقى هذا الافتراض قبولاً إلى حد كبير، ويقوم علماء البيولوجيا الجزيئية بتحديد تسلسلات معينة من د.ن.أ. تساهم في التحكم في الجين، وقد قام الباحثون بذلك، عن طريق إزالة قطع د.ن.أ. بطريقة منتظمة من داخل وحول الجينات الجاري دراستها، ثم إدخال الجينات المتغيرة

فى الخلايا؁ للنظر فى كىففة تأثر التؒغفرات على نشاط الجف؁ ونشمل التسلسلات المنظمة **regulatory sequences** التى تم تحفدها تشمل كلاً من التسلسلات التى تزفد من التعبير الجف؁؁ التى تشمل المحرضات **promoters** والمعجلات **enhancers** والتسلسلات التى نقلل من نشاط الجف؁.

وتعتبر هذه المعرفة أساسفة للعفد من تطبفقات التكنولوففا الفوففة لتكنولوففا الـ د.ن.أ. المطم؁؁ والتعبفر السلفم عن جف؁ منقول فى خلافا أو أنسجة مناسبة فعتبر شرطاً لازماً فى العفد من التطبفقات؁ ففنبطق هذا على الجفود المقترحة لعلاج الأمراض الوراثفة البشرفة بواسطة العلاج بالجب؁ **gene therapy**؁ لكنها تتطبق أيضاً على الجفود المستهلفة لتحسفن المحاصفل الزراعفة؁ عن طرفق فخال جف؁ات جففة؁ ولإنتاج الهرمونات أو البروففنفات الأخرى المهمة تجارفاً فى الخلايا الغرففة.

وعلى الرغم من أن بعض التسلسلات المنظمة قد تعمل على نطاق كبفر من الأنواع أو الخلايا الأخرى؁ إلا أنها لا تتجح إلا مع بعض أنواع الخلايا؁ وعلى سبفل المثال؁ فإن معجلات جف؁ات الأجسام المضادة للثفففات؁ تكون نشطة فى الخلايا المنتجة للجسم المضاد؁ لكنها لا تنشط فى أنواع الخلايا الأخرى؁ وبانضمام جف؁ سفتم التعبير عنه فى خلفة غررفة إلى تسلسلات منظمة تعمل بكفاءة فى هذا النوع من الخلايا؁ فمكن أن فكون نجاحها عظم الشأن ففما بعد فى أى تطبفق تكنولوففى ففوى.

لقيود المفروضة على تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم

Restrictions on recombinant DNA technology

على الرغم من صعوبة حصر الإسهامات التي قدمتها تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم واستنساخ الجين إلى البيولوجيا الجزيئية الأساسية والمجال المتنامي من لتكنولوجيا ، إلا أن الأبحاث لم تخل من انتقادات وخلافات جدلية، فالقدرة على جمع جزيئات د.ن.أ. من كائنات عضوية مختلفة، وإدخال هذه الجزيئات المطعمة في أنواع عديدة، أثار الاهتمام بأن هذه التجارب قد تخلق بدون قصد من العلماء جراثيم جديدة خطيرة، ويمكن أن تهرب من بيئة المعمل، وبلغ الاهتمام أشده بسبب بكتيريا أ.كولاي، التي كانت ولا تزال تستخدم في العديد من لتجارب، والتي تسكن بصورة طبيعية في أمعاء الإنسان.

وكان العلماء الذين يقومون بإجراء التجارب، هم أول من أدرك هذه المخاطر المحتملة، واتخذوا خطوات غير مسبقة ، حيث عقدوا اجتماعاً في عام ١٩٧٤، تحت مظلة الأكاديمية القومية للعلوم National Academy of Science بالولايات المتحدة الأمريكية، وأوصوا بأن أنواع معينة من تجارب الـ د.ن.أ. المطعم للبالغة الخطورة، يجب عدم إجرائها إلى أن يتم عقد مؤتمر دولي لرسم سياسات عامة، تسمح للبحث بأن يجري في أمان، وتضمنت التجارب المحظور إجراؤها تلك التجارب التي يجري فيها إدخال جينات إنتاج السموم أو المقاومة للمضاد الحيوى في الكائنات العضوية التي لا تحتوى عليها بالفعل.

وقد تأخر القرار الرسمي المقصود حتى فبراير عام ١٩٧٥، إلى أن عقد المؤتمر الدولي في مركز مؤتمرات أسيلومار في باسيفيك جروف بولاية

كاليفورنيا، وأوصى المشاركون فى المؤتمر بعدم إجراء أبحاث الـ د.ن.أ. المطعم إلا تحت درجات متزايدة من الموانع البيولوجية أو الطبيعية تبعاً لدرجة الخطورة المتوقعة من التجربة، ويقصد بالمانع الطبيعي **physical containment**، استخدام الوسائل المعملية التى تقلل أو عند مستويات أعلى تمنع هروب الكائنات الدقيقة، ويقصد بالمانع البيولوجي **biological containment**، استخدام الكائنات العضوية أو المنتجات التى تغيرت، بحيث لا يمكنها البقاء إلا فى ظروف معملية خاصة.

وكان على كل دولة ممثلة فى المؤتمر أن ترسم توجيهاتها الخاصة بها، لتصنيف مخاطر تجارب الـ د.ن.أ. المطعم، وتحديد الظروف التى يمكن فى ظلها إجراء التجارب، وفى الولايات المتحدة، أوكلت هذه المهمة إلى لجنة شكلتها المعاهد القومية للصحة (NIH) فى بنسلفانيا بولاية ميريلاند، والتى ساندت فى ذلك الحين معظم الأبحاث الجارية، ولم تصبح توجيهات المعاهد القومية للصحة متاحة للاستخدام إلا فى يونيو عام ١٩٧٦، وفى السنوات المنحصرة، كان العمل بالتوجيهات مهماً بدرجة كبيرة، حيث فشلت الخبرة المتزايدة فى إثبات أية مخاطر من أبحاث الـ د.ن.أ. المطعم فى المعمل.

وأصبحت سياسات المعاهد القومية للصحة لا تطبق فى المقام الأول إلا على الأبحاث التى وافقت عليها المعاهد، وكان يعنى تطور صناعة التكنولوجيا الحيوية، عدم خضوع قدر كبير من أبحاث تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم للتوجيهات، على الرغم من أن الشركات التى كانت تقوم بالأبحاث، كانت تتبعها بصفة عامة بأية حال، ويتركز الاهتمام الحالى إلى حد بعيد على الإطلاق المتأنى الأمن للكائنات العضوية المتغيرة جينياً فى البيئة، التى تشمل على

تَبَتَّ والكائنات العضوية الدقيقة، التي بدأت تنتجها الصناعة للاستخدامات
زراعية، وقد أدى اقتراح معالجة الأمراض الوراثية البشرية بإدخال نسخ
خيمة بدلاً من الجينات المصابة إلى إثارة الاهتمام أيضاً، وقد أخذت موضوعات
تَحْتَر الأخلاقية والتنظيمية للتكنولوجيا الجديدة في الاعتبار، وسوف تناقش في
نِصْف الثامن والسادس عشر من هذا الكتاب.

الفصل الثاني :

تخليق بدون خلايا Synthesis without cells

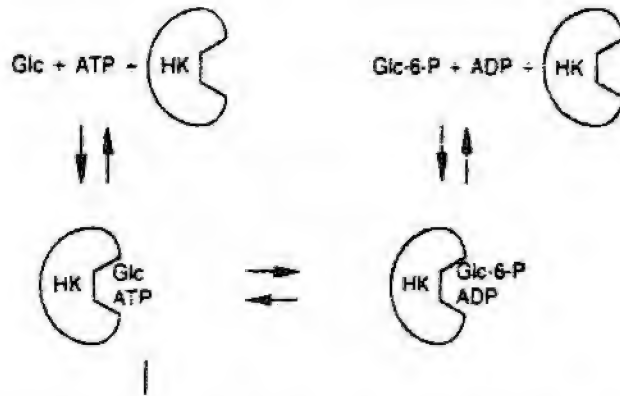
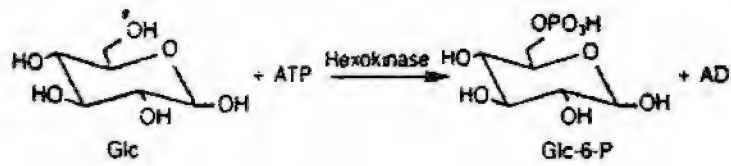
كانت ستجرى معظم التفاعلات الكيميائية التى تحدث داخل الكائنات الحية بصورة بطيئة جداً لدعم الحياة، لولا وجود الحوافز البيولوجية المعروفة بالإنزيمات Enzymes، وغالباً ما تعجل هذه الجزيئات من سرعة التفاعلات بعدة درجات متفاوتة، ومن ثم تتيح للخلايا بأن تحصل على الطاقة التى تحتاجها، وتقوم بتخليق الجزيئات التى تتكون منها، وتهدم وتزيل بقايا منتجاتها، وعلى سبيل المثال، فالخطوة الأولى فى انهضام السكر glycolysis، وهو المسار الأيضى الذى يحول سكر الجلوكوز إلى طاقة كيميائية، يقوم بتحفيزها إنزيم هيكسوكيناز Hexokinase، ويعمل الهيكسوكيناز على تعجيل سرعة التفاعل، إذ يحول الجلوكوز إلى جلوكوز-6-فوسفات، بمقدار ١٠^٩ مرة (أى أن سرعة التفاعل تتم بمعدل مليار مرة مما لو تم التفاعل بدون وجود الحافز الإنزيمى).

لا يقتصر نشاط الإنزيمات على مساهماتها الأساسية فى الأنشطة الخلوية، لكن يوجد لها أيضاً مجال تطبيق واسع فى التكنولوجيا الحيوية؛ فهى تستخدم من بين أشياء أخرى فى صناعة الأغذية لصنع الجبن والبيرة والنبيذ والمخلّيات، من بين أشياء أخرى، وفى الصناعات الكيميائية والدوائية فى تخليق الأحماض الأمينية والمضادات الحيوية، بالإضافة إلى ذلك، فإن لها دوراً أخذاً فى النمو فى مجال الطب، وأحد التطبيقات الدوائية ذو الأهمية المتزايدة استخدام إنزيم يسمى

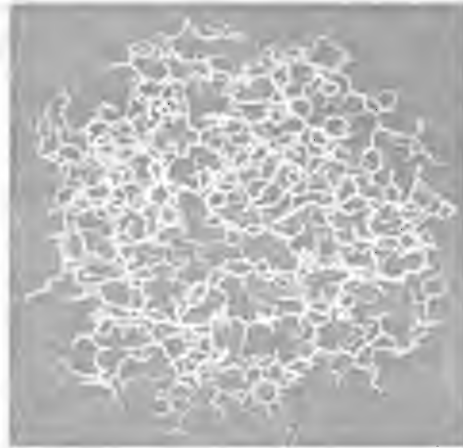
بـمنشط نسيج مولد البلازمين tissue plasmogen activator فى إذابة الجلطات الدموية لمرضى القلب.

وتعتمد تطبيقات التكنولوجيا الحيوية للإنزيمات على خصائصها الفريدة، فالإنزيمات عبارة عن بروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بين ١٠٠٠٠ و ٥٠٠٠٠ ، وعلى سبيل المقارنة، فالماء له وزن جزيئى ١٨، ولملح الطعام وزن جزيئى ٥٩، ويسمح الوزن الكبير للإنزيمات بأن تتخذ أشكالاً ثلاثية الأبعاد محددة تماماً، وتحافظ على توازنها من خلال التفاعلات الداخلية بين الأحماض الأمينية المكونة لها.

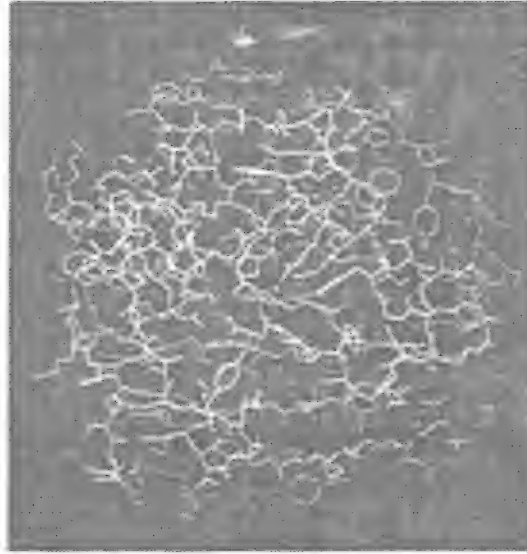
وتعد هذه الأشكال فى غاية الأهمية لأحد أكثر صفاتها أهمية وهى القدرة على التعرف والتأثير بطريقة خاصة على أحد أو بعض المواد، التى تسمى بالركائز substrates، حتى لو كانت المواد موجودة فى خليط معقد، وإنزيم هيكسوكيناز مراكز تعرف للجلوكوز وثلاثى فوسفات الأدينوزين (ATP)، التى ترتبط بأحدها الآخر بالإنزيم بعلاقة وثيقة (شكل ٢-١)، وبعد الارتباط ، تنتقل مجموعة الفوسفات من ثلاثى الفوسفات الأدينوزين إلى الجلوكوز، ومن ثم تنتج ثنائى الفوسفات الأدينوزين (ADP) وجلوكوز-٦-فوسفات، ويطلق الإنزيم بعد ذلك المُنْتَجَيْن، ويمكنه أن يحفز دورة تفاعل أخرى بين الجلوكوز وثلاثى فوسفات الأدينوزين.



شكل ١-٢. يعجل إنزيم هيكسوكيناز (HK) تفاعل الجلوكوز (Glc) و ثلاثي فوسفات الأدينوزين (ATP) لتكوين جلوكوز-٦-فوسفات (Glc-٦-P) و ثنائي فوسفات الأدينوزين (ADP)، و إنزيم الهيكسوكيناز ذاته لا يستهلك أثناء التفاعل.



شكل ٢-٢. نموذج مستخرج من الكمبيوتر لمركز نشاط إنزيم كربوكسي بيبيديز (carbonic dehydratase)، و بشكل مركز النشاط الذي يعتبر منطقة ارتباط البروتين بالركيزة، والذي يتم به النشاط الحفزي، شفا صغيرا في سطح البروتين الإنزيمي.



شكل ٢-٣. ارتباط الركيزة بمركز نشاط إنزيم كربوكسي بيبتيداز أ. والركيزة هنا مشتقة من حمض بنزويل برويونيك ، تتوافق بالقرب من الشق على سطح الإنزيم.



شكل ٢-٤. صورة مكبرة لمركز نشاط إنزيم كربوكسي بيبتيداز أ. و الركيزة هنا ، هي جليسينتروسين شكل البيبتيد ، والأحماض الأمينية للإنزيم التي تعتبر في الارتباط. تظهر باللون الأحمر، وكما هو موضح من خلال الأرقام المبينة لموضعها في سلسلة البروتين، فقد تكون واقعة بعيداً في التسلسل الطولي للبروتين ولكنها تتقارب من بعضها، عندما ينطوي البروتين في تركيبه الثلاثي الأبعاد .

وتتوافق الركيزة مع موقع تعرف محدد على الإنزيم بصورة تشبه تمامًا
 مع مفتاح مع القفل (شكل ٢-٢، ٢-٣) ، غير أن الإنزيمات أكثر مرونة من
 المعدن ، حيث يتغير شكل الإنزيم بعض الشيء تبعًا لارتباطه بالركيزة ،
 يوجد سوى بعض الأحماض الأمينية للإنزيم تكون متصلة بالفعل بالركيزة
 (شكل ٢-٤) ، وقد تتباعد هذه الأحماض الأمينية عن بعضها تمامًا
 على طول التسلسل الطولي للبروتين الإنزيمى ، وإذا تمزق التركيب الثلاثى
 المعدن الذى يضعها فى الوضع السليم للارتباط بالركيزة ، فربما يفقد الإنزيم
 خاصته .

والتخصص الشديد High specificity للإنزيمات فى تعرفها على الركيزة
 وعند عملها الحفزي ، يعد الأساس فى العديد من تطبيقاتها ، وأحد أنواع الانتقاء
 المهمة التى تبديها العديد من الإنزيمات ، هى قدرتها على التمييز بين
 لجزيئات الإنانتيوميرية ، أو جزيئات الصورة المرآوية (شكل ٢-٥) .
 وثنائتيومرات (enantiomers) هى أيسومرات مجسمة لها نفس التركيب
 كيميائى ، فى حين أن ذراتها مرتبة فى الفراغ بطريقة مختلفة ، ويمكن أن
 تكون الإنانتيومرات من أى جزء له ذرة كربون غير متماثلة ، أى ذرة
 كربون مرتبط بها أربع مجموعات مختلفة ، ولا يمكن تمييز معظم الخصائص
 الطبيعية للإنانتيومرات ، ولذا يعصب فصلها .

ومع ذلك فعادة ما يمكن أن تتمايز الإنزيمات فيما بينها ، وعند تعريض
 مزيج من الأنانتيومرات N-acetyl-L-alanine و N-acetyl - D-alanine
 لإنزيم acylase I لا ينشأ عنه إلا إزالة مجموعة acetyl من L-
 enantiomer ، ويطلق التفاعل L-alanine الذى يعتبر إنانتيومر
 موجود بصورة طبيعية لهذا الحمض الأمينى . ويمكن فصل
 الحمض الأمينى الحر بسهولة من N-acetyl-D-alanine الثابت ،

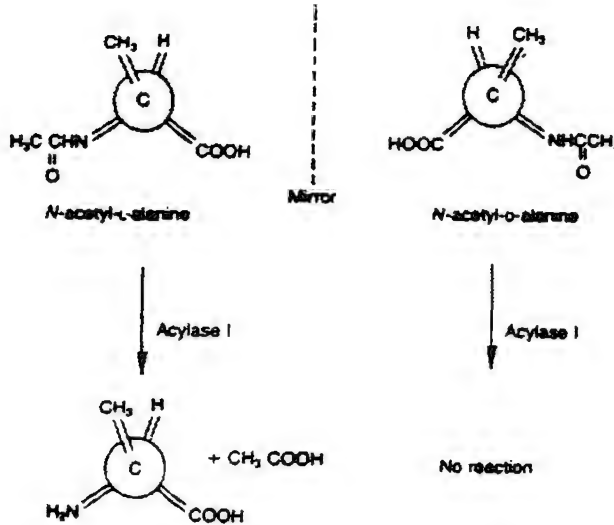
وعلى ذلك توفر عملية التميؤ الإنزيمى للإنانتيومر الانتقائى أسلوبًا سهلاً ويمكن استخدامها على نطاق واسع لفصل الإنانتيومرات .

ولأساليب الفصل هذه أهمية عظيمة جدًا ، فغالبًا ما تتصرف الإنانتيومرات بطريقة مختلفة تمامًا فى النظم البيولوجية ، فقد يكون إحداها دواء مفيدًا ، فى حين يكون البعض الآخر شديد السمية ، ويعطى عقار ثالدوميد *thalidomide* مثالاً لذلك ، فالإنانتيومر النقى $R(+)$ يعتبر مهدئاً أمناً نسبياً ، وقد نتجت عيوب الولادة الخطيرة التى حدثت عندما أعطى الثالدوميد للمرأة الحامل بدلاً من إعطائها كميات صغيرة جدًا من إنانتيومر $S(-)$ كانت موجودة فى صورة (شوائب) ، ومع ازدياد الاهتمام بتخليق الدواء وزيادة ضغط الوكالات المنظمة للصحة ، تقدم حالياً حوافز مهمة لابتكار طرق لصنع عوامل دوائية خالية من التلوث بالإنانتيومرات غير المرغوبة.

وللحافزات الإنزيمية عدة خواص أخرى مهمة بالإضافة إلى خاصية تخصصها للركيزة ، فهى تخضع لنظم ؛ أى أن هناك جزيئات أخرى يمكن أن تعدل أنشطتها - وهى خاصية على درجة من الأهمية للتحكم فى المسارات الكيميائية الحيوية فى الخلية ، وعلاوة على ذلك ، تعمل الإنزيمات فى ظل ظروف معتدلة ، حيث يعمل معظمها بصورة جيدة فى الماء عند أس هيدروجينى متعادل ، وفى درجة حرارة الغرفة ، وهذه الظروف مواتية تماماً للتطبيقات الصناعية ، فيما يتعلق بتوفير الطاقة والحفاظ على البيئة ، وغالبًا ما يتطلب القيام بإجراء تفاعلات كيميائية مشابهة بدون استخدام الإنزيمات ظروفًا صعبة ، تتضمن درجات حرارة عالية ، وأسس هيدروجينية قلوية أو حمضية جدا ، وربما الأكثر أهمية من وجهة نظر صناعية ، أنه يمكن للإنزيمات القيام بالتفاعلات التى لا يمكن إجرائها بأى

سريعة أخرى، وقد تستخدم على وجه الخصوص في تخليق الجزيئات البيولوجية لمعدّة التي لا يمكن تخليقها بأية وسيلة أخرى.

، لعب الرئيس للحافزات الإنزيمية ، هو أنها هشة نسبيا بالمقارنة بالحافزات غير العضوية مثل البلانتيوم أو حمض الكبريتيك، وغالباً ما يخمد نشاط إنزيمات بفعل درجة الحرارة التي تزيد عن درجة حرارة الغرفة، التي تمزق تركيباتها الثلاثية الأبعاد ، وقد تفقد نشاطها أيضاً إذا ما تعرضت للهواء أو لمخيمات العضوية أو إلى ظروف حمضية أو قلوية. وهشاشة الإنزيمات يعد عيب على وجه الخصوص لأنها لا تزال الأكثر تكلفة نسبياً بالنسبة لمعظم الحافزات غير الإنزيمية، على الرغم من أن طرق إنتاج الإنزيمات آخذة في التحسن.

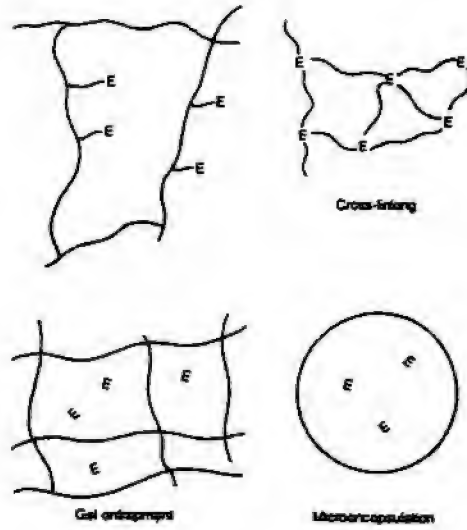


شكل ٢-٥. للحمض الأميني ألانين مركزاً غير متمثل ، فهو يوجد في صورتين متماثلتين غير أنهما ليسومرات صور مرئية من أحدهما الأخرى ، وتسمى تركيبات يمثل هذه الصور المرئية بالإنليومرات ، ويدعى ألانين L-enantiomer أحد الإنليومرات الموجودة في البروتينات وتوجد معظم مشتقات الألانين الأخرى بصورة طبيعية، ونادراً ما يوجد D-alanine في الطبيعة.

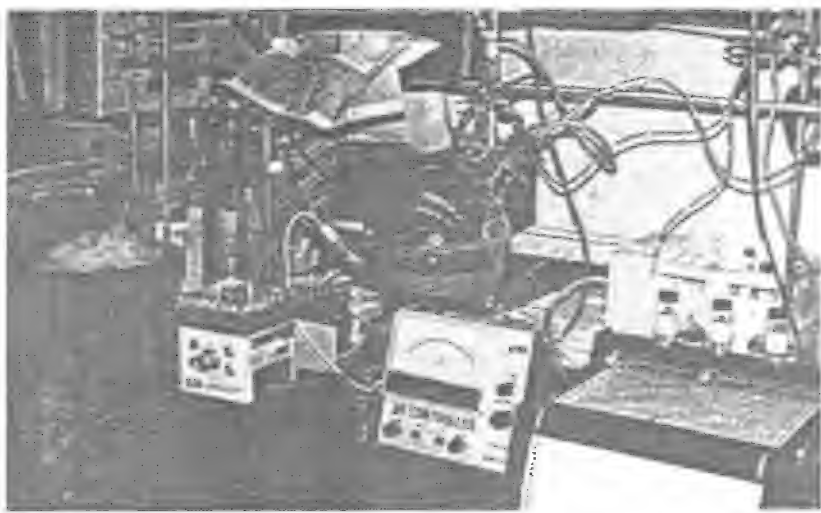
وعلى الرغم من ذلك يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق تطوير طرق لتثبيت الإنزيم . وتوفير بيئة تطيل من عمر الإنزيم تعد مسألة تجربة وخطأ ، فى حين أن تثبيت الإنزيم أحد الأساليب التى تتجح غالباً ، وفى نفس الوقت تقلل من تكلفة استخدام الإنزيمات .

ويمكن مثل حركة الإنزيم بتركيزه أو تطويقه بدعامة صلبة ، وهو إجراء يعطى بعض المميزات العملية التى تفوق استخدام الإنزيم فى صورة سائلة ، ويرسخ تثبيت الإنزيمات إلى حد ما ، يجعلها أكثر مقاومة لقوى القص ، ولهجوم البروتيازات proteases عليها ، التى تعتبر فئة من الإنزيمات ، تعمل على تحطيم البروتينات الأخرى ، بالإضافة إلى ذلك ، يمكن فصل الإنزيم المشلول الحركة بسهولة عن الخليط فى نهاية التفاعل ، وبذلك يمكن استخدامه مرة أخرى ، وتؤدي هذه الاستعادة إلى سهولة عزل المنتج وتقليل تكلفة التفاعل .

ويمكن مثل حركة الإنزيمات ، إما كوحدات نقية أو كعناصر من مجموعة من الخلايا ، تكون عادة ميتة ، وتتضمن طرق مثل الحركة ، ربط الإنزيم بصورة تساهمية بدعامة صلبة ، أو احتجازه فى طبقة جل ، أو تشبيك جزيئات الإنزيم ببعضها ، أو تغليفها فى خلايا اصطناعية صغيرة (شكل ٢-٦) .



٢-٢ طرق شائعة لتثبيت الإنزيمات، تتضمن (E) ربطها بالأسطح (ربط تساهمي) ، واحتجازها في طبقة من الجيل، وتشبيك
حرمت الإنزيم ببعضها وعزل الإنزيمات في خلايا اصطناعية.



شكل ٢-٧ مفاعل معمل يحتوى على إنزيم مشلول الحركة.

وبمجرد أن يشل حركة إنزيم ، فيمكن أن يستخدم فى أى نوع من المفاعلات reactors العديدة ، التى لكل منها مميزاته وعيوبه ، فمفاعل العبوة batch reactor ، وهو خزان يحتوى على الإنزيم والركيزة (شكل ٢-٧) ، من المفاعلات التى يسهل إقامتها ، غير أن الخليط الذى يتطلب تقليباً مستمراً ، يؤدى أحياناً إلى هدم الإنزيم ، ومن المفاعلات شائعة الاستخدام فى التطبيقات الصناعية ، مثل إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز high - fructose corn syrup ، مفاعل القاعدة الثابتة fixed bed reactor ، ويتكون هذا المفاعل من عمود يتم حشوه بإنزيم مثبت ، وتنساب الركيزة خلاله (شكل ٢-٨) . وتعد الطريقة من الطرق الفعالة ، ويمكن تحويلها إلى صورة أوتوماتيكية بالرغم من أنه قد يحدث انسداد للعمود فى بعض أوضاع شل الحركة ، والمفاعل ذو القاعدة المسيلة fluidized bed-reactor ، الذى يجعل الركيزة تصعد لأعلى ، بأن يسلك الإنزيم سلوك السائل يحل هذه المشكلة ؛ ومع هذا فإن هذا الإجراء يعتبر أكثر تعقيداً وكلفة عن الطرق الأخرى .



شكل ٨-٢ مفاعل عمودي يحتوى على إنزيم مشلول الحركة .

استخدامات الإنزيمات الحالية

Current uses of enzymes

الأغذية والمشروبات

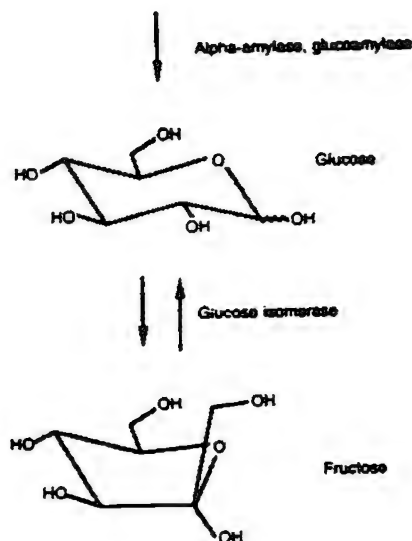
Food and beverages

استخدمت الإنزيمات منذ فترة طويلة في تصنيع الجبن والبيرة والنيبيذ ، وبدأ استخدام الإنزيمات في التطبيقات الصناعي يتزايد في الآونة الأخيرة بشكل ملحوظ ، ويعتبر شراب الذرة عالي الفركتوز high - fructose corn syrup ، من المنتجات التي يجري إنتاجها بكميات كبيرة ، ويتم تصنيعها بواسطة تكنولوجيا الإنزيم المثبت في الولايات المتحدة الأمريكية ، ويعتبر الشراب الذي ينتج من الهضم الإنزيمي لنشا الذرة أحلى من سكر السكروز ، ويستخدم في صناعة المشروبات لإضفاء النكهة على المشروبات غير المسكرة ، ويستخدم في صناعة المخبوزات التجارية في تحلية البسكويت والكعك ، ويمكن أن تحول عملية تجارية كبرى مليوني رطل من نشا الذرة إلى شراب ذرة عالي الفركتوز في غضون يوم واحد .

وتتطلب عملية تحويل نشا الذرة إلى شراب ، ثلاثة إنزيمات (شكل ٢-٩) ، فالمعالجة بإنزيم alpha-amylase وإنزيم glucomalylase ، يحول أولاً النشا إلى شراب يحتوى على جلوكوز ، بعد ذلك يؤثر أيزوميراز الجلوكوز المثبت على الجلوكوز ، وينتج مزيجاً من الجلوكوز والفركتوز ، الذى يعتبر أكثر حلاوة ، وعلى ذلك يعتبر ذا قيمة أكبر من الشراب نفسه المحتوى على الجلوكوز .

وفي صناعة الألبان ، تعتبر الإنزيمات من العوامل المهمة في تصنيع الجبن ، ويحتوى اللبن على مجموعة بروتينات تسمى بالكازينات caseins ،

يُحد هذه البروتينات هو kappa-casein يمنع اللبن من التخثر في وجود أيونات الكالسيوم ، ويعمل إنزيم الأنفحة rennin ، الذي يتم الحصول عليه تجارياً من الجدار المبطن لمعدة العجول على هدم الكازين وتحويله إلى روتين صغير يسمى بـ para-casein . وبمجرد هدم الـ para-casein ، تحدث عملية التخثر لتكوين خثارة لبن ناعمة صلبة ، يمكن فصلها عن الجزء سائل من اللبن ، وخثارة اللبن هي المادة البادئة في إنتاج الجبن .



شكل ٩-٢ يحضر شراب الذرة على الفركتوز ، وهو من المحليات الصناعية المهمة من نشا الذرة بواسطة إنزيمات ~~alpha-amylase~~ ، و ~~glucoamylase~~ ، glucose isomerase . والشراب مزيج متعادل من الجلوكوز والفركتوز .

والسائل المتبقى بعد فصل خثارة اللبن هو "مصل اللبن" whey ، ويحتوي هذا المصل من بين عناصر أخرى على بروتينات وسكر غير محلى ولاكتوز ، وعلى الرغم من أن هذه المواد ذات قيمة غذائية عالية ، فلم تبتكر حتى الآن

استخدامات كاملة لمصل اللبن ، لأن العديد من الأشخاص لا يستطيعون هضم اللاكتوز ، وإذا وجد السكر بكميات كبيرة في الغذاء ، ولم يتحلل أثناء الهضم ، تقوم الكائنات الدقيقة داخل الأمعاء بالتهام اللاكتوز وتحدث غازات تسبب متاعب معوية ، وكان مصل اللبن يمثل في الماضي مشكلة في التخلص منه .

وتستكشف الأبحاث الحالية طرق لاستخدام الإنزيمات في تحويل مصل اللبن إلى مادة يمكن استخدامها كمادة مضافة إلى الغذاء ، وعندما يعالج مصل اللبن بإنزيم اللاكتوز ، فإن اللاكتوز يتحلل إلى اثنين من السكريات الحلوة القابلة للهضم وهما : الجلوكوز والجالاكتوز ، ويمكن إضافة الشراب الحلو الغني بالبروتين الناتج إلى منتجات غذائية معينة ، مثل الآيس كريم .

ولاحتياج صناعة الجبن إلى مادة الأنفحة rennet - المسحوق الجاف المحتوي على الخميرة المجبنة للبن - بكميات كبيرة ، فقد ابتكرت بدائل لمنسج العجل ، الذي يستخرج منه الأنفحة ، وفي الوقت الحالي ، تستخدم الأنفحة المأخوذة من الكائنات الدقيقة على نطاق واسع ، لكنها تتج جبناً ذا جودة منخفضة ، وذلك لأن النشاط الإنزيمي الميكروبي يصعب إخماده عن إنزيم العجل، عند الرغبة في إبطال مفعوله ، وفي الوقت الحالي ، يجرب علماء شركة جينتك Genetech Inc.، بجنوب سان فرانسيسكو في كاليفورنيا ، طرق لاستنباط أنفحة ميكروبية محسنة ، إحدى هذه الإمكانيات هي استخدام أساليب الـ د.ن.أ. المطعم في تعديل الإنزيم الميكروبي المهندس وراثياً بحيث يقل ثباته، ويمكن إخماد نشاطه بتسخينه لفترة وجيزة في الوقت المناسب .

وفي صناعة المشروبات beverage industry ، تستخدم الإنزيمات في العصائر المقاومة للقشعريرة chill-proof juices ، كالنبيذ والبيرة ، وتحتوي العصائر والنبيذ

على سكر عديد يسمى بالـ بكتين pectin، الذي يصبح سائلاً في درجة حرارة الغرفة، وحينما يبرد قد يصبح معلق غروي، يكسب السائل مظهراً ضبابياً، وينزل المظهر الضبابي في أوروبا على علامة الجودة العالية في زجاجات عصائر الفاكهة، في حين يعتبره معظم المستهلكين في الولايات المتحدة الأمريكية صفة غير مستحبة، ولمنع تكون الضباب، تضاف إنزيمات تسمى بـ pectinases إلى العصير أو النبيذ، ويقوم الإنزيم بهدم البكتين إلى وزن جزيئي منخفض، وبذلك تصبح أجزاء العصير أو النبيذ أكثر سيولة، ولا تكون رواسب عند التبريد.

وتحدث مشكلة مماثلة لتكون الضباب أثناء صناعة البيرة، بالرغم من أن لمركبات المسببة للمشكلة في البيرة، هي بروتينات وأغصان tannis بدلاً من كونها سكر عديد، وتصبح البروتينات والأغصان معلقة في الجعة، وتترسب عندما يبرد السائل، وبذلك تكسبه المظهر المعتم. وتضاف بروتيازات للبيرة للمقاومة للقشعريرة chill-proof beer، مثل البيبسين pepsin أو الباباين papain، نهضم البروتينات وتقليل تكون الضباب المسبب للقشعريرة كما يطلقون عليه.

وهناك استخدام آخر للإنزيمات، هو تصنيع الحلويات منخفضة التركيز، وتصنع الملبسات أولاً من ركائز السكر الصلب المحتوى على إنزيم انفرتاز invertase، وفي غضون مدة تتراوح ما بين ثلاثة إلى أربعة أسابيع، يحول الإنفرتاز السكر إلى خليط سائل من الفركتوز والجلوكوز، وبالإضافة إلى أن الخليط أحلى من السكر، فإن الفركتوز له ميزة الاحتفاظ برطوبة أعلى، بحيث يمنع وجوده أيضاً جفاف الحلوى، ومن أن يكون مذاقها غير مستحب.

وتعد الإنزيمات مهمة أيضاً في تغليف الأغذية ، حيث يمكن دهان الغلاف المصنوع من البلاستيك المستخدم لتغليف الجبن ، على سبيل المثال ، بطبقة من الجلوكوز وإنزيمى جلوكوز أوكسيداز وبروكسيداز ، لمنع الجبن من التلف. وتبطئ هذه الطبقة من نمو النكهة الكريهة ، ائتنى يمكن أن تحدث نتيجة تفاعل الأكسجين مع عناصر الجبن ، وتحت تأثير الجلوكوز أوكسيداز ، يتفاعل الأكسجين بدلاً من ذلك مع الجلوكوز الموجود في الغلاف البلاستيك ، لتكوين حمض الجلوكونيك وبيروكسيد الهيدروجين ، ويتحول باتلالى إلى ماء بواسطة البروكسيداز ، ولا تؤثر النواتج المتولدة من هذه الطريقة على مذاق الجبن، وبالمثل ، يمكن إضافة أوكسيداز الجلوكوز إلى المايونيز لمنع من التلف بسبب الأكسدة ، ومقدار الإنزيم المستخدم فى هذه الطرق ضئيل للغاية .

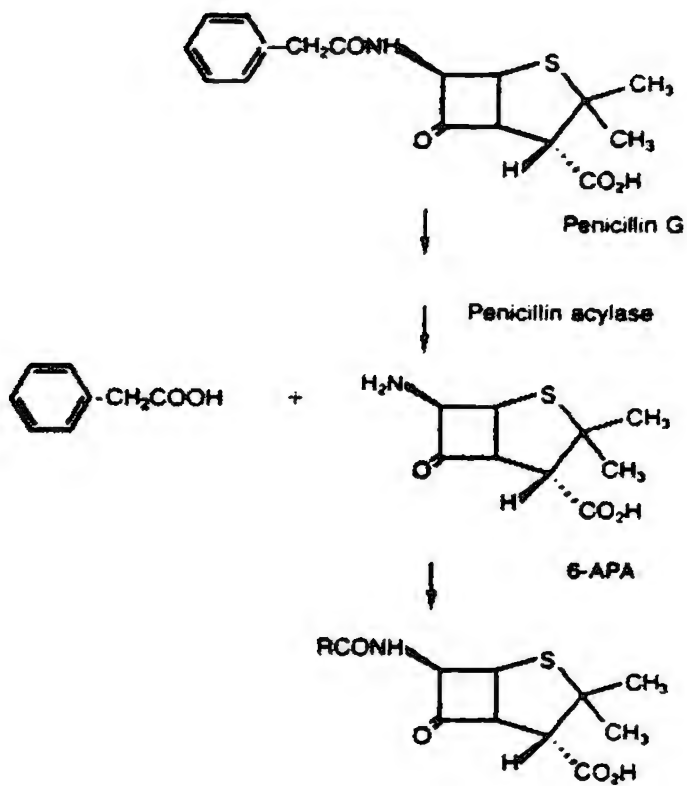
مواد كيميائية بكميات كبيرة

Large volume chemicals

على الرغم من أن أضخم قدر من التحويلات التى تقوم بها الإنزيمات يحدث فى مجال تصنيع الأغذية كما فى حالة تصنيع شراب الذرة عالى الفركتوز ، فإن الإنزيمات تستخدم أيضاً فى تخليق المواد الكيميائية ، ويحتمل أن تكون أهم هذه المواد الكيميائية ، الأحماض الأمينية ، اللازمة لتخليق البروتين وكإضافات غذائية لمرضى المستشفيات ، الذين لا يستطيعون تناول طعامهم بطريقة طبيعية، وكأعلاف للحيوان ، وكوسائط كيميائية .

وعلاوة على ذلك ، تعتمد بعض التحويلات فى مجال التخليق الدوائى على الإنزيمات. وعلى سبيل المثال، فالبنسلين G ، وهو المضاد الحيوى المنتج

جرونيك، يتحول عن طريق الإنزيم بنسيلين أسيلاز إلى حمض ٦-aminopenicillanic ، الذي يعتبر المادة البادئة لإنتاج مركبات البنسيلين شبه تخيعة (شكل ١٠-٢).



شكل ١٠-٢ يحلل إنزيم أسيلاز البنسيلين مقبلاً بطريقة تنقلية ، رابطة أميد الملسلة الفرعية في البنسيلين G المتلحة بسهولة، ويكون حمض ٦-aminopenicillanic (٦-APA)، الذي يعتبر المادة البادئة لتخليق عدد كبير من مركبات البنسيلين شبه التخليقية

المنظفات

Detergents

أفضل الوسائل المتاحة لإزالة بقع بروتينية، مثل بقع البيض والدم أو النجيل من الملابس، هي إنزيمات البروتياز الهادمة للبروتين، وفي عام ١٩٦٦، أدخل إلى الولايات المتحدة الأمريكية أول منظف للغسالات محتوئ على الإنزيم ، وفي بداية السبعينات، أدت المخاوف من احتمال أن يكون للإنزيمات الموجودة في المنظفات تأثيرات ضارة، مثل تهيج الرئة، نتيجة استنشاق عمال هذه الصناعة والمستخدمين لها غبار الإنزيم إلى سحب المنظفات من الأسواق، ومع ذلك، ظلت المنظفات تستخدم في أوروبا، حيث ثبت لهم أنها وفعاليتها عندما تعد وتتداول وفقاً لطريقة سليمة، ويجرى إعادة إدخال المنظفات المحتوية على الإنزيم إلى الولايات المتحدة، حيث لا تزيد نسبة المنظفات المحتوية على إضافات البروتياز عن ١٥%.

الاستخدامات الطبية

Medical applications

تتحكم الإنزيمات وتجرى عددًا هائلًا من التفاعلات الكيميائية التي تتم داخل جسم الإنسان، فهي تتوسط عملية هضم الغذاء، وتبنى عناصر الخلايا، وتولد وتستجيب لرسائل ضمنية، مثل الهرمونات والمرسلات العصبية الكيميائية، التي تنقل الإشارات العصبية، وتعد الإنزيمات مفيدة في كل من دراسة هذه النظم المعقدة وأحياناً في بعض أنواع العلاج الطبي. وفي أحد التطبيقات العلاجية البسيطة، يعطى خليطاً بسيطاً عن طريق الفم من إنزيمات

تريمية يسمى بـ بنكرياتين "pancreatin" كعامل مساعد على الهضم
تحتص الذين يعانون من نقص الإنزيمات الهاضمة، نتيجة لخلل وراثي، أو
نتيجة لعملية جراحية، أو عند تقدم السن.

ويتم تطبيق طبي متقدم استخدام إنزيم هباريناز heparinase فى التحكم فى
حجم الدم. وغالباً ما يعالج المرضى المصابين بالديليزة الكلوية kidney dialysis
بصور معينة من الجراحة، أو المصابين بالنوبات القلبية heart attacks أو
نبت الدماغية، بسكر عديد polysacchride، يسمى هبارين heparin ،
مصرغى تقليل قابلية الدم للتجلط، وعلى الرغم من أن العلاج بالهبارين ليس
مصرغى عذبة، إلا أنه قد يكون من الضرورى أحياناً عكس تأثيره بسرعة إذا كان
مريض ينزف بكميات كبيرة، على سبيل المثال . ويمزق الهباريناز الهبارين
عيرة لتقائية ، ومن ثم يوقف نشاطه، ويحاول الباحثون الطبيون استخدام
ترييد الذى يشل حركته على مرشح، لجعل تأثيرات الهبارين المضادة للتجلط
عكسية ، وعندما تصبح هذه الحالة ضرورية، يجرى تدوير دم المريض خارج
تحت. عن طريق مرشح بمساعدة الهباريناز المثبت ، ثم يعاد إلى المريض
وهناك استخدام علاجى إنزيمى ذو إمكانية فعالة هائلة، وهو العلاج بمنشط
سيج مولد البلازمينوجين tissue plasminogen activator (TPA)، الذى يساعد
على إذابة الجلطات الدموية التى تتكون أثناء النوبات القلبية، فإذا أمكن إذابة أى
خثرة فى وقت مبكر نسبياً، يمكن تلافى الضرر الدائم لعضلة القلب، أو على
أبهر، للتقليل من تأثيرها .

وفى الماضى، كان يجرى عزل منشط نسيج مولد البلازمين من النسيج
لرحمى البشرى human uterine tissue بصعوبة بالغة، وكان ما يتوفر منه
تخصيفات عديدة ضئيلاً جداً، وعلى الرغم من ذلك، يمكن أن ينتج حالياً بكميات

كبيرة بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، ويتوقع أن يكون أول منتجات التكنولوجيا الرئيسة الجديدة، الذى يدخل مجال الرعاية الصحية البشرية. ويتصف الإنزيم بمزية انتقائية عالية high selective ، فهو لا يتعامل إلا مع الجلطة، ولا يسبب إلا أضراراً طفيفة فى مكان آخر من جسم المريض، وقد جاءت الاختبارات الأولية لمنشط نسيج مولد البلازمين عند استخدامه فى إعادة فتح شرايين القلب بنتائج طبية، على شرط أن يبدأ العلاج بسرعة بعد تكون الجلطة، وللعديد من الإنزيمات الأخرى التى تشمل اليروكيناز والبرو-يوروكيناز والاستربتوكيناز تأثيرات مضيئة للجلطة، وقد يكون لها فوائد علاجية للمصابين بالنوبات القلبية، عندما يجرى العلاج بهذه الإنزيمات بمفردها أو بالاشتراك مع منشط نسيج مولد البلازمين.

وقد بدأ استخدام الإنزيمات فى تعديل البروتينات، وهو تطبيق ستتعاظم أهميته، حيث أصبح يتوفر الكثير من البروتينات التى لها استخدامات طبية أو استخدامات أخرى عن طريق تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، وتعتبر الإنزيمات هى الحافزات المؤهلة لهذا الغرض، لأنها تقدم الانتقائية المطلوبة لهذا المجال الصعب من الناحية التكنولوجية .

وأول مثال تجارى لتعديل الإنزيم لبروتين للاستخدام البشرى، هو تحويل إنسولين خنزيرى porcine insulin إلى إنسولين بشرى، فمرضى البول السكرى Diabetes الذين يضطرون إلى الحقن بالأنسولين للسيطرة على مرضهم، يصابون أحياناً بحساسية ضد أنواع من البروتينات الخنزيرية أو البقرية، لكن تبهم يقل عندما يستخدمون الإنسولينات البشرية التى كانت متوفرة بكميات قليلة حتى فترة قريبة.

وعلى الرغم من أن الإنسولينات البشرية والخنزيرية لا تختلف عن بعضها . في حمض أميني واحد ، فلم تكن تتوفر الطرق الكيميائية لتحويل أحدهما ححر ، بيد أن ذلك يمكن أن يتم بواسطة الإنزيمات . أولا ، يطوق الإنزيم حرء الرئيسي من بروتين الإنسولين الخنزيري ، القريب من الحمض الأميني غير المرغوب فيه ، وبذلك يزيله على قطعة بيبتيدي صغيرة ، بعد ذلك وفي ظروف تفاعل مختلفة ، يحل إنزيم آخر محل القطعة التي أزيلت ، عن عريق لصق الببتيدي البشري المماثل مكان الجزء الخنزيري المبتور ، والببتيدي لتري من النقص بحيث يمكن تخليقه كيميائيا ، والكثير من الأنسولين البشري ، لى يباع لمرضى البول السكرى فى أوروبا ، هو أنسولين خنزيري تم تحويله لى تسلسل حمض أميني بشرى بهذه الطريقة .

وقد بذلت جهود عديدة لعلاج السرطان باستخدام الإنزيمات ، لكنها لم تعط حى الآن أوجه نجاح كبيرة ، وعلى سبيل المثال ، فالأسباراجيناز asparaginase ، الذى يحول الحمض الأميني L-asparagine إلى حمض نأسبارتيك ، جرى استخدامه فى علاج مرض سرطان الدم leukaemia ، وينبى أن لبعض خلايا سرطان الدم متطلبات أعلى من L-asparagine عن الخلايا الطبيعية ، وكان الأمل فى أن حقن الإنزيم فى الدم ، سيققل من L-asparagine المتاح لخلايا السرطان ، ويجعلها تتعطش لمزيد من الغذاء المطلوب ، وقد أثبت العلاج فائدة قليلة ، لأن الزورام غالبا ما تبدى مقاومة له ، وتوجد للـ L-asparagine تأثيرات سمية جانبية .

الكيمياء التحليلية

Analytical chemistry

الإنزيمات هي أدوات تحليلية على درجة كبيرة من النفع للتطبيقات الطبية وغير الطبية ، وبسبب تخصصها ، فإنه يمكن استخدامها في اختبار مقدار مادة ، حتى لو كانت لإنزيم آخر ، أو في خليط معقد مثل الدم أو البول أو السوائل البيولوجية الأخرى ، وغالبًا ما يقترن عدد من التفاعلات الإنزيمية مع بعضها في محلول ، بحيث يبلغ تسلسل التفاعلات الحفزية الإنزيمية ذروته في تحويل الـ NAD^+ (ثاني نكليوتيد أدنين أميد النيكوتين) إلى $NADH$ ، الصورة المختزلة من الجزيء ، وينشأ عن هذا التحويل تغير في قدرة العينة على امتصاص الضوء ، الذي يمكن قياسه بسهولة بواسطة سبكتروفوتومتر^(١) ، ويعتمد العديد من اختبارات التشخيص التي يقوم بها الأطباء على الإنزيمات ، وتستخدم الأنزيمات بصورة روتينية في قياس تركيزات الجلوكوز ، واليوريا ، والأحماض الأمينية ، والإيثانول ، وحمض اللكتيك في السوائل البيولوجية ، وفي التعرف على البروتينات والأحماض النووية .

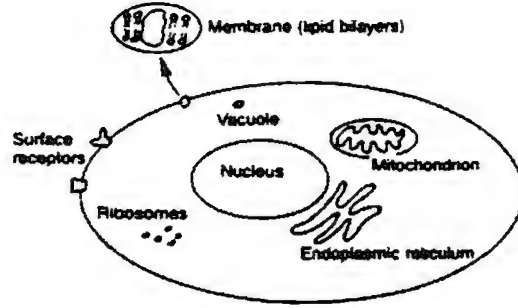
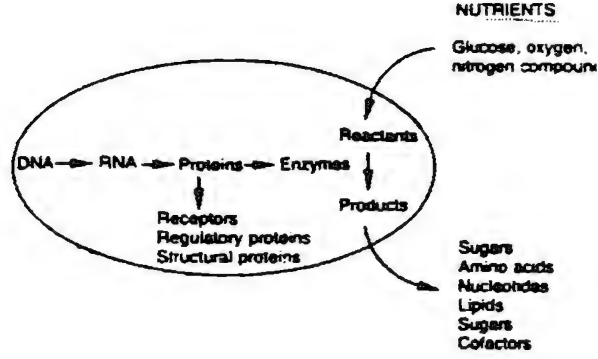
وغالبًا ما تعتمد أساليب التشخيص المنزلية أيضًا على الإنزيمات ، فعلى سبيل المثال ، يجب على مرضى البول السكري مراقبة نسبة الجلوكوز في البول ، كمؤشر لاحتياجهم للأنسولين ، ويجرى تحليل الجلوكوز بسهولة عن طريق غمس عصا اختبار تحليلية في عينة بول ، وتحتوى العصا على إنزيمات جلوكوز أوكسيداز والبيروكسيداز بالإضافة إلى كاشف ، يسجل التفاعل مع الجلوكوز عن طريق تغير اللون .

(١) السبكتروفوتومتر : أداة لقياس شدة الضوء النسبية بين مختلف أجزاء الطيف .

استخدامات جديدة ممكنة للإنزيمات

Potential new uses of enzymes

تتضمن معظم التطبيقات الحالية للإنزيمات في الصناعة والأبحاث على عمليات بسيطة نسبياً، مثل تحويل النشا إلى شراب الذرة العالى الفركتوز، وفى المستقبل، قد تستخدم الإنزيمات كحافزات فى الكثير من النظم المعقدة، والعديد من الجزيئات المهمة بيولوجياً، المحتوية على سكر عدادى، وأحماض أمينية، وبروتينات، على درجة من التعقيد بحيث لا تخلق بسهولة بواسطة طرق الكيمياء العضوية القياسية، ولما كانت الإنزيمات تعمل بصورة جيدة فى التحويلات المتضمنة على هذه المواد، فتسعى جهود البحث الحالية إلى ابتكار طرق إنزيمية لتخليقها.



شكل ١١-٢ ينظر كل من الكيميائيين والبيولوجيين إلى الخلية بطريقة مختلفة، فالكيميائيون يهتمون بالتفاصيل الجزيئية (أ)، بينما يدرس البيولوجيون الوظائف العامة للخلية (ب).

وسيمثل النجاح في هذه الجهود خطوة كبيرة نحو تحقيق هدفين، الأول، عندما يتمكن العلماء من الحصول على هذه المركبات البيولوجية المعقدة بسهولة، فسوف يصبحون في وضع أفضل لفهم الأسس الجزيئية للحياة، ثانياً، ستقدم هذه الصورة الجديدة من التكنولوجيا الحيوية، الأدوات لصنع منتجات مفيدة، ليس فقط للبيولوجيا، ولكن أيضاً للطب والزراعة.

وسوف ينظر الكيميائي المهتم بتحويل الخصائص الخفية الفريدة للإنزيمات إلى الخلية بطريقة مختلفة عن أي بيولوجي عادي (شكل ٢-١١) ، فالبيولوجي يهتم بتركيب ووظيفة الخلية . وعناصرها ، وبفهم الطريقة التي تعمل بها الأجزاء معًا ، والكيميائي التخليقي يعتبر الخلية كحقيبة من الحفازات الإنزيمية ، التي يمكن أن يوضع بداخلها المواد المتفاعلة ، وسيأتي منها بالمنتجات المفيدة ، وعلى الرغم من ذلك ، يحتاج الكيميائي إلى المعلومات التي يجمعها البيولوجي .

ويطلب تطوير تكنولوجيا الإنزيم الجديدة ، تصميم النظم التي تتنافس تعقيد بعض المسارات الأيضية الرئيسية للخلية . والإنزيمات والركائز ، بالإضافة إلى جزيئات أساسية أخرى تسمى بالعوامل المساعدة cofactors ، سوف يتم تجميعها في دورات معقدة ، وعند هذه المرحلة ، لا يستطيع أحد أن يعرف بالضبط مدى تعقد هذه لنظم ذات الأيض الصناعي ، بينما لا تزال عملية ، وتهدف أبحاث الإنزيمات الحالية إلى تطوير وتحسين طرق لتجديد العامل المساعد ، ولستكشاف وتوسيع مدى التركيبات المقبولة كركائز ، وتخليق الجزيئات الكبيرة التي لا يمكن الحصول عليها بطرق التخليق العادية ، وتطوير نظم للأيض الصناعي ، وإجراء هندسة وراثية للإنزيمات الجديدة أو المتغيرة .

العوامل المساعدة وتخليق الإنزيم المحفز

Cofactors and enzyme-catalyzed syntheses

يمكن تصنيف الإنزيمات بطرق عديدة، إحدى هذه الطرق عن طريق احتياجها للعوامل المساعدة ، وهى المواد ذات الوزن الجزيئى المنخفض التى تساهم أيضاً فى التفاعل المحفز بالإنزيم، فالعامل المساعد NAD، على سبيل المثال، يعمل كعامل مؤكسد فى بعض التفاعلات الإنزيمية، فى حين تعمل صورته المختصرة NADH كعامل مختزل، وهناك عامل مساعد آخر يعمل كواهب لمجموعة فوسفات.

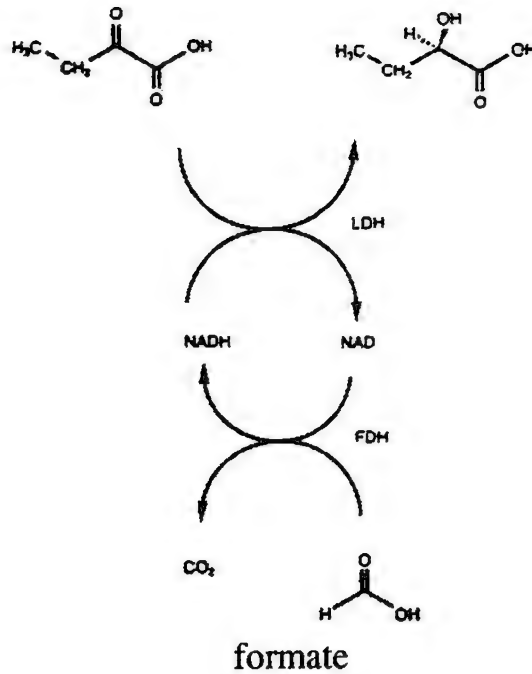
والإنزيمات التى تتطلب عامل مساعد إضافي، تكون بصفة عامة أكثر صعوبة فى الاستخدام فى العمليات التجارية الكبيرة عن تلك الإنزيمات التى لا تحتاج إلى عوامل مساعدة إضافية ، ولما كانت تكلفة العوامل المساعدة مرتفعة- حيث تكلف الـ NADH ذات درجة نقاوة ٩٨% حوالى ١١٠٠٠ دولاراً للرطل الواحد- فسوف يكون استخدامها مكلفاً بدرجة كبيرة فى تفاعل محفز بالإنزيم، الذى يستهلك جزيئاً واحداً من العامل المساعد مقابل كل جزيء يتكون من المنتج.

ويمكن حل هذه المشكلة عن طريق إقران تفاعل تجديد العامل المساعد بالتفاعل الذى يستهلك فيه، وهى استراتيجية تشبه مثيلتها المستخدمة فى الطبيعة، ويحول إنزيم آخر ومواد بادئة رخيصة صورة منتج العامل المساعد إلى صورته المتفاعلة الأصلية، وهناك طريقة لاختزال الـ NAD بواسطة ملح حمض الفورميك وفورمات إنزيم dehydrogenase، قام بتطويرها زيف

سك Zeev Shaked وجورج هوايتسايدش George Whitesides من
جامعة هارفارد في كمبردج ، بولاية ماساتشوستس ، تعتبر مثالا لنظام تجديد
عمل مساعد مقترن كهذا (شكل ٢-١٢) .

وحتى تكون نظم تجديد العامل المساعد عملية ، فمن الضروري أن
كون قادرينا على تخليق الكواشف المجددة الأساسية بطريقة اقتصادية ،
وأصبحت النظم التجديدية العملية متوفرة لثلاثة من أكثر العوامل المساعدة
همية ، وهي : ATP و NAD و NADH ، وعلى الرغم من أنه في
مكانية النظم حاليًا أن تقدم عدة كيلوجرامات من المنتج ، إلا أنه على
مستوى الصناعي لم يستخدم منها شيء .

ولبعض الإنزيمات عوامل مساعدة مثبتة بداخلها بطريقة فعالة ، فهي ترتبط
بصفة قوية بالبروتين الإنزيمى ، وتتجدد كجزء من النشاط الإنزيمى الطبيعى ،
ولما كانت لا تتطلب هذه الإنزيمات نظم تجديد عامل مساعد خارجية ، فإنها
تعتبر أسهل فى الاستخدام عن تلك الإنزيمات التى تتطلب عامل مساعد إضافى
. والتيروسيناز tyrosine الذى يحفز تكوين الحمض الأمينى تيروسين ،
ولتربتوفاناز typtophanase الذى ينتج الحمض الأمينى تريبتوفان ، يعتبران
مثلاً للإنزيمات المزودة بعوامل مساعدة ، ويمكن صنع أحماض أمينية مختلفة ،
عن طريق تنوع الركائز التى تتغذى عليها هذه الإنزيمات .

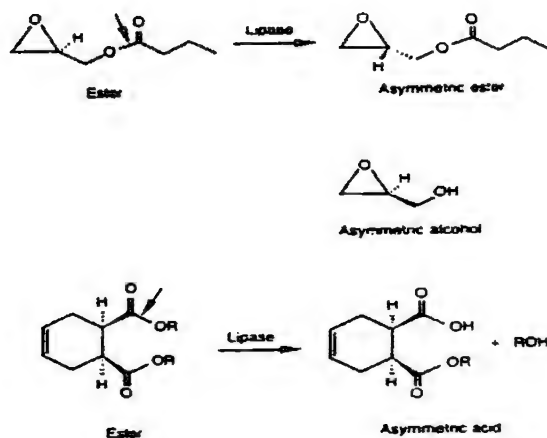


شكل ١٢-٢ يحول نظام تجديد عامل مساعد مقترن الـ NAD^+ إلى صورته المختزلة (NADH) ، وبمبدأ إنزيم لاكتات ديهيدروجيناز (LDH) يختزل حمض ألفا - كيتوبترك إلى حمض ألفا - هيدروكسي بترك ، فإنه يستخدم الـ NADH ، بعد ذلك يحدد إنزيم فورمات ديهيدروجيناز (FDM) الـ NADH بأكسدة حمض الفورميك إلى ثنائي أكسيد الكربون .

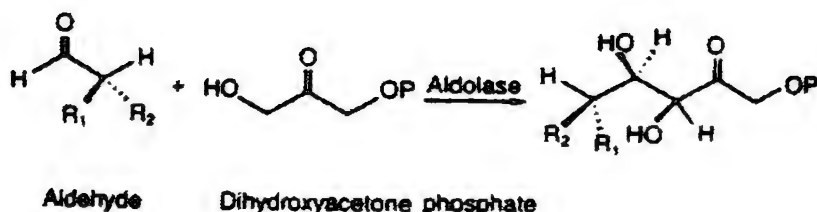
ولا تتطلب الإنزيمات الأسهل استخدامًا في التخليق العضوي أية عوامل مساعدة إضافية على الإطلاق ، وينتمي لهذه الفئة الليباز Lipase والألدولاز aldolase ، فالليباز يحفز على شطر روابط الأستر لإنتاج الحمض الحر والكحول ، وركائزه الطبيعية ، هي الفوسفوليبيدات Phospholipides ، وإسترات الحمض الدهنية للجليسرول ، وإسترات الكلسترول والمواد المتصلة بها ، ويمكن أن تعمل أيضًا سلسلة كبيرة من الأسترات التي لا توجد في الطبيعة ، كركائز لهذا الإنزيم .

والليباز lipase ، هو إنزيم آخر ، يمكنه أن يساعد على عزل تـختيـومرات الفردية (شكل ٢-١٣) ، وإذا كان الحمض أو الجزء الكحولي من ركيزة أستر ، له مركز غير متماثل ، فغالبًا ما يشطر الإنزيم أستر أحد تـختيـومرات بطريقة أسرع من أستر الإنانتيومر الآخر ، وفي هذه الحالة ، سوف ينتج التفاعل المحفز بالليباز ، كحولا أو منتجًا حمضيًا غنيًا بسبب تـختيـومر المنطلق بسرعة أكبر ، وتفيد منتجات كهذه في التفاعلات التخليقية .

ويحفز الألدولاز aldolase على تكوين كربون - رابطة كربونية بين هـوسفات ثنائي الهيدروكسي أستون وأي واحد من تشكيلة الأليدهيدات الكبيرة (شكل ٢-١٤) ، ويجري حاليًا دراسة التخصص الإنزيمي نحو الأليدهيدات aldehydes المختلفة والتخصص الملموس للتفاعل .



شكل ٢-١٣ يحفز الإنزيم ليباز على شق الأسترات ، ويطلق الكحول والحمض ، اللذين كتبا مرتبطين في الأصل بجزء الأستر ، والروابط التي يشطرها الإنزيم محددة بالأسهم ، وكحول الأستر المبين في التفاعل (أ) له كربون غير متماثل ، ولذلك يوجد في أي من الصورتين الإينتيوميريتين ، وفي مثل هذه الظروف ، فقد يشق الليباز الأستر المحتوى على إينتيومر واحد ، إما بطريقة بطيئة أو لا يشقه على الإطلاق ، ويمكن أن يستخدم في فصل الإينتيومرات ، ولا يحتوي الأستر المبين في (ب) على مركز غير متماثل ، في حين يخلق الليباز مركز غير متماثل في الحمض الناتج عن إزالة أحد الكحولين .



شكل ١٤-٢ يحفز الألدولاز تفاعل الديهيد وفوسفات ثنائي هيدروكسي أستون ليعطي منتجا ألدوهوليا ذا كيميائية مجسمة معروفة.

توسيع نطاق ركائز الإنزيمات

Extending the substrate ranges of enzymes

وكما ذكرنا من قبل، فإن تخصص الإنزيمات لركائز معينة، هو الأساس في معظم استخداماتها في الكيمياء العضوية، ومع ذلك، تتنوع درجة تخصص الإنزيمات المختلفة، فالبعض منها يقبل ركيزة واحدة، بينما يقبل البعض الآخر العديد من الركائز، ويمكن لإنزيم الهكسوكيناز Hexokinase، على سبيل المثال، التفاعل مع أكثر من ثلاثين مركباً، تنتمي من حيث التركيب إلى الجلوكوز، وغالباً ما تقبل الإنزيمات ركائز "غير طبيعية"، لا توجد في الطبيعة، بالإضافة إلى الأنواع الطبيعية.

وغالباً ما يوجه برنامج بحثي نموذجي لتخليق الإنزيم المحفز إلى صنع جزيء معين، إما لأنه مهم في حد ذاته، أو لإمكانية استخدامه كنقطة بداية في تخليق المركبات الأخرى، فإذا كان هناك إنزيم معروف بإنتاجه لجزيئات متشابهة، فيمكن أن يبدأ البرنامج بإجراء دراسة لسلسلة الركائز التي يتعرف

عنها ، وتقدم الدراسة فهمًا لكيفية عمل الإنزيم ، وقد تؤدي إلى التنبؤ بركائز أخرى ممكنة ، ومع ذلك ، فإذا كان الإنزيم لا يعمل بصورة جيدة مع الركائز غير الطبيعية مثل عمله مع الركائز الطبيعية ، فقد لا يزال التحول مفيدًا ، وخصوصًا إذا لم يكن من المستطاع صن المنتج بأية وسيلة أخرى .

وفي المرحلة التالية ، يحدد البحث على نطاق محدود أفضل الظروف لدرجات الحرارة ، والأس الهيدروجيني والملح وتركيزات الركيزة للتفاعل المحفز بالإنزيم ، فإذا كان تثبيط الإنزيم أمرًا مرغوبًا فيه ، وإذا كان تجديد العامل المساعد ضروريًا ، فستستبطن نظم مناسبة ، وأخيرًا ، يتم جمع معلومات كافية ، بحيث يمكن أن يجرى التفاعل على نطاق كبير تتطلبه العمليات التجارية ، وزيادة نطاق التفاعل هذا سيصبح صعب أن لم تؤخذ في الاعتبار المشاكل الموجودة في هندسة المصنع .

تعديل الأنزيمات

Modification of enzymes

لا توجد حفازات إنزيمية معروفة للعديد من التفاعلات المهمة للكيميائيين التخليقيين، وأحيانًا، يميل مسح عشوائي لإنزيمات لم تكن مستكشفة من قبل، أو مصادر إنزيمية، اللثام عن النشاط الحفاز المرغوب، بيد أن هذه العملية لا تكفي وتتطلب مجهودًا بشريًا مكثفًا ، ومن أحد الآمال المثيرة في المستقبل ، تعديل الإنزيمات الموجودة لتغيير أو لتحسين تخصصها ، وأكثرها إثارة ، إمكانية تصميم إنزيمات جديدة وإنتاجها بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم ، على الرغم من أن هذا الهدف متروك للمستقبل البعيد ، ولتحقيق هذا الهدف ، فإنه يتطلب معرفة تفصيلية للعلاقات بين تسلسل الحمض الأميني والتركيب

الثلاثى الأبعاد للبروتين والتعرف الحفرى والتأثير ، أى من هذه المعلومات غير متاح حاليًا ، على الرغم من أن الباحثين قد بدأوا فى اكتسابها .

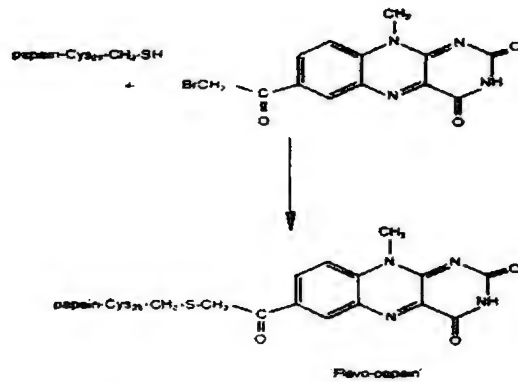
ومع ذلك ، فسوف يمضى بعض الوقت قبل أن يتمكن الكيميائيون من تخليق إنزيمات جديدة من لاشيء ، ويعتبر التخليق الكيميائى للإنزيم ككل عن طريق الإنشاء التدريجى لسلسلة الحمض الأمينى أمرًا ممكنًا من الناحية الفنية ، إلا أنه حتى الآن ليس ممكنًا من الناحية العملية ، وتكمن إحدى الصعوبات فى التنبؤ بالكيفية التى ينطوى بها تسلسل طولى لأحماض أمينية معينة ، فالأحماض الأمينية لأحد المراكز الفعالة للإنزيم ، التى تعتبر جزء من الجزيء الذى يتصل بالركائز ويؤثر على تحويلها إلى منتجات ، تعتبر بعيدة بشكل متكرر عن بعضها البعض فى سلسلة البروتين الطولية ، ولا ترتبط إلا إذا انطوى الإنزيم على التركيب الفراغى الصحيح .

وهناك صعوبة أخرى تتعلق بتحديد أى الأحماض الأمينية الذى يندمج فى مركز النشاط ، ويمكن أن تقدر النماذج الكمبيوترية مساهمة أحماض أمينية معينة فى ربط الركيزة والحفز ، لكن العول على هذه التقديرات ، قد تم التحقق منه بالتجربة فى حالات قليلة فقط ، ولا يزال مطلوب معرفة الكثير ، قبل أن تصبح للنماذج قيمة تنبؤية فعالة .

وتتجه الجهود البحثية حاليًا نحو تعديل الإنزيمات الموجودة ، فبمجرد أن يتم تحديد الأحماض الأمينية الموجودة داخل أو بالقرب من مركز النشاط الإنزيمى ، فيمكن أن تعدل إما عن طريق التغيير الكيميائى المباشر أو عن طريق التغيير الجينى المحدد الموقع ، وتتيح التحولات الكيميائية لأحد الأحماض الأمينية ، بأن يتحول إلى حمض آخر ؛ أو قد ترتبط مجموعة متفاعلة مع بعض

حمض الأمينية لتغيير تفاعلية مركز النشاط، فعلى سبيل المثال، فإن papain وهو بروتيناز قد قام بتحويله د. لورانس D. Lawrence وأى. E. Kaiser من جامعة روكفلر إلى بروتين نشط فى عمليات الأكسدة والاختزال، وقد قاما بهذا من خلال لصق مجموعة فلافين ب كبريت من بقايا سئين (أحد الأحماض الأمينية) (شكل ٢-١٥)، والفلافينات هى العوامل المساعدة فى تفاعلات الأكسدة-الاختزال التى يحفزها عدد من الإنزيمات.

يعد تولد الطفرة محدد الموقع الإنزيم عن طريق دمج طفرة معينة فى الجين معطر، ويحدد التسلسل الطولى للأحماض الأمينية فى البروتين الإنزيمى وحدة التسلسل الطولى للنكليوتيدات فى د.ن. أ. الجين، مع النكليوتيدات الثلاث لمكونة لكودون فى كل حمض أمينى (راجع الفصل الأول)، وإذا عرف تسلسل الحين الذى يشفر عن الأحماض الأمينية لمركز نشاط الإنزيم، فغالباً ما يمكن تبديل أحد الأحماض الأمينية بآخر، عن طريق تغيير نكليوتيد واحد فقط فى كودون المناسب.



شكل ٢-١٥ يتعد إنزيم بابين بطريقة كيميائية عن طريق الارتباط بمجموعة فلافين، التى تغير تفاعلية الإنزيم.

والطريقة التى يمكن الوثوق والتنبؤ بها لتعديل الجين المشفر عن بروتين،
هى طريقة "تولد الطفرة الموجهة قليلة النكليوتيد" ، وتتضمن هذه الطريقة تخليق
جزء صغير من الـ د.ن.أ (قليل النكليوتيد) يناظر تسلسل الجين الذى سيطفر
ماعدًا تغير فى قاعدة معية واحدة ، وعندما يدخل إلى خلايا مناسبة، يعمل قليل
النكليوتيد هذا كبادئ لنسخ الـ د.ن.أ ، وتكون النتيجة أن يندمج التسلسل المتغير
فى الجين ، وتنتج صور الاستغلال الأخرى توليد وتحديد وعزل المستنسخات
الطافرة التى تنتج الإنزيم المعدل ، الذى غالبًا ما يكون ذا كفاءة عالية .

وقام الآن فريشت Alan Fresht من الكلية الملكية للعلوم والتكنولوجيا
Imperial College of Science and Technology فى لندن بإجراء هذا
النوع من الهندسة الوراثية على جين إنزيم tyrosyl-tRNA synthetase ،
وقد كان من نتيجة ذلك أن غير مخلفات السستين إلى مخلفات سيرين عند الموقع
٣٥ للإنزيم ، والفرق الوحيد بين الحمضين الأمينيين هو أن للسيرين مجموعة
sulphydryl (-SH) ، فى حين أن للسستين مجموعة hydroxyl (-OH)
وننتج عن الطفرة تغيرًا فى انجذاب الإنزيم enzyme's afifinity لركائزه ،
لأن الحمض الأمينى المتأثر ، يشارك فى ربط الركيزة ، ويكون السيرين روابط
هيدروجينية أقوى من السستين ، وقد تغير عدد آخر من الأحماض الأمينية أيضًا
بإنزيم tyrosyl-tRNA aynthetase ، واستخدمت فى استكشاف آلية عمل
الإنزيم .

نظم الإنزيم المتعددة

Multi-enzyme systems

الاستخدام المهم المحتمل للإنزيمات ، هو النظم الإنزيمية المتعددة ،
بما كانت معظم الإنزيمات نشطة تحت نفس الظروف في الماء عند درجة
حرارة الغرفة وأس هيدروجيني ٧ تقريباً - فسوف تبدي جميع الإنزيمات
لمختلفة نشاطاً حافزاً عندما تخلط في نفس المحلول ، وعلاوة على ذلك ، فإن
تخصصات الركيزة للإنزيمات سوف تسمح لكل إنزيم بأن يؤثر على ركائزه
لحصة دون تدخل من تأثير الإنزيمات الأخرى ، وإذا كان منتج كل تفاعل
يرمى هو ركيزة لإنزيم آخر ، فسوف تقترن التفاعلات داخل سلسلة ، بنفس
لضريقة التي تتكون بها المسارات الأيضية للخلية من سلسلة من التفاعلات
نمقرنة مبدئية من التفاعلات الأولية إلى المنتجات النهائية .

وقد يصطلح على تسمية النظم المصممة معملياً لمجموعات معقدة من
تفاعلات إنزيمية مقترنة بـ "الأبيض الصناعي" . بيد أن هذه النظم معقدة من
حيث التصميم والتشغيل ، والتحكم الدقيق في تركيزات الإنزيم بالنسبة لبعضه
لبعض لإعطاء تركيزات مثالة من المواد الوسيطة في تسلسل ، وتكوين أى من
لعوامل المساعدة الإنزيمية الأساسية يعتبر مسألة مطلوبة لمنع تكون المواد
لوسيط المعوقة أو استنزاف العوامل المساعدة ، فوجود أى منها ، يمكن أن
يعيق النظام .

ولا يزال استخدام نظم الإنزيم المتعددة لإجراء التخليق الكلى لجزيئات معقدة
حالياً في مراحله التجريبية ، أحد الأمثلة على مثل هذا النظام الذى قام بتطويره
Huey Wong في معمل هواتسيدز في هارفارد ، يستخدم ست إنزيمات
متعاونة لتحويل - ٦ - glucose phosphate و N-acetylglucosamine

إلى lactosamine وهو ثنائى سكريات، يوجد كجزء من مجموعات الكربوهيدرات، التى ترتبط بسطوح بروتينات عديدة.

ونظم الإنزيم المتعددة، المستخدمة فى تخليق كربوهيدرات معقدة، قد تصبح فى النهاية وسيلة مفيدة لتكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم، ولا تحتوى بروتينات الحيوانات الثديية التى تصنع فى أ.كولاي، والبكتيريا الأخرى بطرق الـ د.ن.أ.المطعم، على الكربوهيدرات التى تحتوى عليه عادة، حيث لا تستطيع البكتيريا إضافة المادة إلى البروتينات، وإذا ثبت فى النهاية أن الكربوهيدرات ضرورية للوظيفة الطبيعية للبروتينات، فسوف يجرى البحث عن طريقة لإضافتها، وقد يساعد الأيض الصناعى فى هذا الخصوص.

عبرت اقتصادية : المستقبل

Economic considerations : the future

مميزات

Economic

على الرغم من التعرف على آلاف الإنزيمات ، إلا أن القليل منها يحظى أهمية تجارية ، فلا يوجد على مستوى العالم سوى عشرين إنزيمًا في سوق ، وقد المكتب الأمريكي لتقييم التكنولوجيا « US Office of Technology Assessment ، أن هذا السوق قد انتج في عام ١٩٨٥ وحده ، ٦٠٠ مليون دولار أمريكي ، بلغت قيمتها ٦٠٠ مليون دولار أمريكي ، يستخدم في الولايات المتحدة أيسومراز الجلوكوز واثنين من الأميلازات لإنتاج سكر الذرة العالى الفركتوز من نشا الذرة ، التى تقدر بحوالى ٥٠% من سوق الإنزيمات ، وقد وفر الشراب للولايات المتحدة حوالى ١,٣ بليون دولارًا في لتبادل الخارجى من سكر البنجر والقصب فى عام ١٩٨٠ ، والإنزيمات الأخرى التى يجرى إنتاجها بكميات كبيرة ، الأنفحة التى تستخدم فى صناعة نخب ، والبابين المستخدم فى صناعة البيرة المقاومة للقشعريرة ، والبروتيازات المستخدمة فى المنظفات .

ويعتقد أن يكون احتمال النمو على المدى القصير فى سوق الإنزيم لصناعى احتمالاً متواضعاً ، فهناك عدد من التطبيقات الجديدة للإنزيمات يجرى استكشافها ، فى حين أن عدد العمليات الجارى تطويرها بصورة نشطة لاستخدام بكميات تجارية قليل ، ويحتمل أن تتضمن الفرص الأكبر للتفاعلات على الماء ، وفى اليابان يجرى استكشاف nitrile hydratase الذى يستخدم فى صنع acrylamide و acrylonitrile فى صناعة اللدائن بشكل نشط ، وللعديد

من تطبيقات الليبازات المستخدمة فى إنتاج الكيماويات الدقيقة ، خصوصاً بالنسبة للوسائط الأنانتيوميرية فى صناعة الأدوية تطبيقات واعدة ، بالإضافة إلى ذلك ، فقد استفيد من الإنزيمات فى التعامل مع مشكلة النفايات السامة الخطيرة ، وعلى سبيل المثال ، فقد ابتكرت نظم إنزيمية تجارية للقضاء على أيونات السيانيد فى المخلفات السائلة من المصانع الكيماوية فى الآونة الأخيرة ، ومعالجة المياه من التطبيقات التى نشأت بسبب الضغوط الاجتماعية والتنظيمية . وبصفة عامة يتصف تطوير التكنولوجيات الجديدة المركزة على الإنزيم ، والمستخدمه فى الصناعات الكيماوية بالنمو البطيء والربحية البسيطة فى هذا المجال ، وعلاوة على ذلك ، فإن غالبية المنتجات الحالية للصناعة الكيماوية ، تعتبر منتجات غير قابلة للذوبان فى الماء ، وبذلك لا تعتبر أهدافاً نموذجية للتحويل الإنزيمى .

١- مستقبل التكنولوجيات المرتكزة على الإنزيم ، حينئذ ؟

في المدى الطويل فهي ذات مستقبل باهر لأسباب عديدة .

تتم تكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم أسلوبًا جديدًا لتخفيض تكاليف إنتاج الإنزيمات النادرة ، وكانت الإنزيمات المستخدمة حتى فترة قريبة ، هي الإنزيمات التي يمكن تحضيرها بتكلفة رخيصة بالطرق الميكروبيولوجية عتيقة . وهناك بحث يستهدف استنباط تطبيقات تجارية تركز على هذه الطرق . لأنها كانت الطرق الوحيدة التي يمكن أن تتأسس عليها عملية اقتصادية ، لعل هذا القيد الاقتصادي ، سيسمح للبحث الجاري باستكشاف تطبيقات جديدة . مثل التخليق الكيميائي ، لمجرد أن اعتبرت الإنزيمات أدوات البحث الحديثة ، وسوف تنتج أي من هذه الإنزيمات التي تم التعرف عليها بأنها تحمل سمات مبشرة في التخليق الاقتصادي بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم .

والموضوعات البيئية بدءًا من معالجة الماء الملوث والتخلص من المخلفات الصناعية إلى تطوير طرق تصنيع كيميائية ، التي أدرك المجتمع أنها طرقًا آمنة - تعد حاليًا من الاهتمامات الكبيرة ولا تتجاهلها كل الصناعات ، وإن إدراكنا سمًا بهذه الحقيقة ، يعطي مبررًا لتطوير تكنولوجيات تركز على الإنزيم معنجة المخلفات والتخليق الكيميائي ، وحتى لو كانت هذه التكنولوجيات تتنافس مع التكنولوجيات التقليدية على الإطلاق ، فسوف تفضل الطرق الإنزيمية ، لأن الإنزيمات تعمل في الماء في درجات حرارة منخفضة ، وغالبًا ما يكون لها نواتج ثانوية قليلة .

وتتطلب الصناعة الدوائية على وجه الخصوص ، مجموعة جديدة تمامًا من التكنولوجيات لكي تتعامل مع الفرص التي تقدمها التكنولوجيا الحيوية ، والعديد

من المنتجات التى تظهر من التكنولوجيا الحيوية ، هى من الأنواع التى ليست لدى صناعة الأدوية خبرة كبيرة نسبياً بها ، والدليل على ذلك ، البروتينات مثل البروتين المذيب لتجلط الدم TPA ، وأنترليوكين - ٢ المنظم لجهاز المناعة ، والسكر العداى مثل حمض الهالورنيك hyaluronic acid الذى يستخدم فى جراحات العين eye surgery ، وقطع الحمض النووى المستخدمة فى تحليل الـ د.ن.أ. ويستخدم الإنزيم فى كل أنواع هذه المركبات بشكل فعال . وسوف يتضح الدور المهم الذى يلعبه التخليق الإنزيمى وتعديل المواد. وقد لا تكون قيمة الإنزيمات المستخدمة فى هذه التطبيقات قيمة كبيرة ، فى حين تكون القيمة المضافة للمنتج من خلال المعالجة بإنزيم مناسب قيمة كبيرة .

وحتى بالنسبة للأصناف الموجودة من المنتجات الدوائية ، فسوف تلعب الإنزيمات دوراً متزايداً فى تقديم الوسائط النقية فى صورة إنانتيوميرية ، وفى القيام بالتحويلات الصحية ذات الانتقائية العالية ، وسوف تدخر الإنزيمات دائماً للمهام « الصعبة » وهى الإنزيمات المقاومة للمحلول بالطرق التقليدية ، ويرجع تعقيد الأنشطة الجارية لتطوير الدواء إلى أن المشاكل الصعبة من الأمور المعتادة.

وسوف تستمر تخصصية الإنزيمات فى أن تصبح الطرق التحليلية المفيدة ، فالتطور المستمر وتسويق الإلكترونيات التى تحتوى على الإنزيمات المثبتة ، سوف يجعل اختبار العديد من المواد البيولوجية المائية عملاً روتينياً ، وغالباً ما تسمح تخصصية الإنزيمات بقياس دقيق لإحدى المواد فى خليط معقد بدون تحضير أية عينات .

وسوف تلعب الإنزيمات دوراً كبيراً فى تصنيع الأغذية، والدوافع القوية الكبيرة فى هذا المجال ، هى الأمان وتقليل التكلفة ، وتقى الإنزيمات بكلاهما فى

محلات تطبيق معينة ، ومع أن صناعة الغذاء هي صناعة مقاومة للتغيير تكنولوجيًا ، فسوف يأتي التغيير بشكل بطيء ، وتقوم معظم الصناعات كيميائية على تقليل استهلاك الوقود البترولي ، وعلى المدى الطويل ، وخصوصًا في الدول النامية ستكون هناك مبررات اقتصادية لاستخدام المواد ذوينة المشتقة بيولوجيًا ، التي تشمل على السليليوز والنشا واللجنين ولبروتيينات النباتية ، بدلاً من المنتجات البترولية ، ومن المؤكد أن الإنزيمات سوف تلعب دورًا في تصنيع المواد البيولوجية .

إن خطى البحث عن العلاقة بين تركيب إنزيم ونشاطه العقار خطى كبيرة جدًا وعلى الرغم من أن هذه المشاكل تعتبر من المشاكل المعقدة جدًا ، فسوف يصبح من الممكن في النهاية - ربما في غضون من ٢٠ إلى ٥٠ سنة - استنباط بروتينات تحفز أنواع جديدة من التفاعلات وتنتج هذه الإنزيمات غير لطبيعية بطريقة اقتصادية بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم ، وأول تطبيق لهذا النوع من النشاط ، يظهر حاليًا في صورة برامج متواضعة ، تستخدم تولد لظفرة المحددة الموقع ، في تعديل خواص الإنزيمات الحالية ، وسوف تتطور هذه البرامج بشكل طموح مع مرور الزمن .

الفصل الثالث

الكائنات المجهرية مصادر للمواد الأولية الكيميائية

Microorganisms as producers of feedstock chemicals

الإنتاج الميكروبي للمواد الكيميائية الصناعية من مصادر متجددة

Microbial production of industrial chemicals from renewable resources

تعتبر المواد الكيميائية الأولية هي المواد الخام للصناعة الكيميائية، فهي تستخدم كمواد بادئة لتخليق سلسلة ضخمة من المواد الكيميائية الأخرى - اللدائن، والمطاط، على سبيل المثال، وكمذيبات، ولتصنيع منتجات عديدة تشمل لمنسوجات والورق (جدول ٣-١).

وكانت المواد الكيميائية الصناعية تنتج في الأصل من استخلاص مواد من لبينات مثل الزيوت النباتية، والنشاء، والسلولوز، والخشيبينات^(١)، والشمع، وتجدد هذه المواد الخام المحتوية على الكربون بصورة مباشرة بواسطة المختزال التخليقي الضوئي لثاني أكسيد الكربون من الجو، ويمكن أن تتحول هذه المواد كيميائياً إلى مواد أخرى، وبذلك تزيد بدرجة كبيرة من عدد المنتجات التي يمكن الحصول عليها من المملكة النباتية.

١ - الخشيبين: المادة أو المواد الثلاثية التي تجعل للأعضاء المخشوشية صلابتها وخصائصها الكيماوية.

(مترجم)

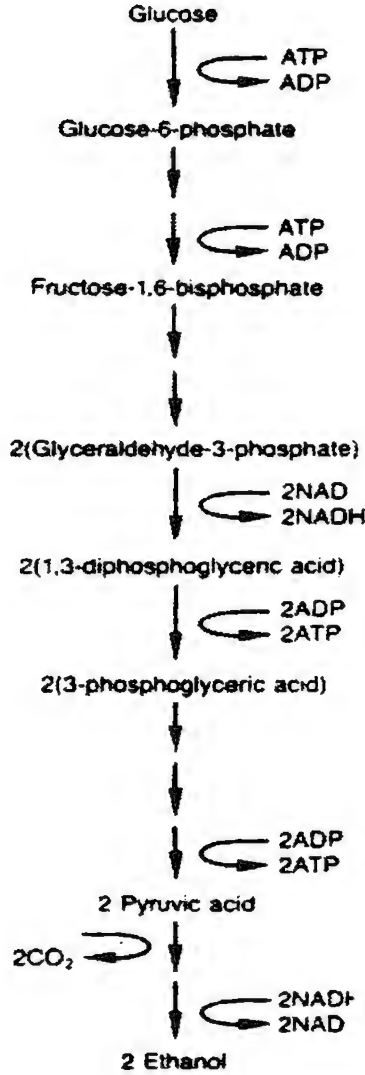
جدول ٣-١. المواد الكيميائية الصناعية الناتجة عن التخمر

Industrial chemicals produced by fermentation

المادة الكيميائية المنتجة	المصادر الميكروبية	الاستخدامات المتعددة
حمض الفورميك	فرشاشيات	صباغة لتسريع معالجة الجلود بلاء الكهرباء، تصنيع المطاط
ليثولول	الفطر العسري	مذيب صناعي، وسيط للخل، إسترات وإيثيرات، والمثروبات
حمض الخليك	باصيلات خلية	مذيب صناعي، وسيط في العبيد من الكيمياء، العضوية مستحضرات طعام
حمض الجليكوليك	الرشاشيات	تصنيع المنسوجات، سبط الأس الهيدروجيني، لولاصق منقذات
حمض الأوكساليك	الرشاشيات	الطباعة والصباغة، عامل تبيض، سفتزل
جليسرين	الفطر العسري	مذيب، ملدن محلي، تصنيع متفجرات، طباعة، ألوات تجويل، صابون، مقاوم للتجمد
سكر إيثوبولون	باسيل	مقاوم للتجمد، مذيب تصنيع الراتنجيات، تخليقية، مقلع للعفن
إيثوبروتيكول	المجزات الخلية	مذيب صناعي، مستحضرات تجويل، مقاوم للتجمد، أحبار
خلون	المجزات الخلية	مذيب صناعي، وسيط في الحديد من الكيمياء، العضوية
حمض المالونيك	فطر العفن	تصنيع العقارات، النمو، والممكنة
حمض اللبن	العصية اللبنية، المكورات العظيمة	محمض للطعام، صبيغ، وسيط لأصلاح حمض اللبن، صباغة الجلود
حمض الأكريليك	باسيل	وسيط صناعي، للدقن
بوتانول	المجزات الخلية	تصنيع الأمترات
٢،٣ ثيوتنديول	البكتيريا الهوائية العصوية	وسيط في صناعة المطاط المخلق، للدقن، مقاوم للتجمد
ميثيل ثيل كيتون	الحرشاشية الوحيدة (طحلب)	مذيب صناعي، وسيط في المتفجرات والراتنجيات، تخليقية
حمض الفورميك	جنريات	وسيط للراتنجيات، التخليقية، الأصباغ، محمض مقاوم للاكسدة
حمض الكبريتيك	جنريات	تصنيع ورنيشات، تلك، أصباغ، تصنيع استرات العطور
حمض فتاح	الرشاشيات	محمض
حمض الطرطريك	باصيلات خلية	محمض، الدبغ، استرات تجارية، لورنشات، تلك، طباعة
حمض الإيتكوتيك	الرشاشيات	تصنيع المنسوجات والورق، وسيط للدقن

وتقوم الكائنات المجهرية بالعديد من هذه التحويلات، التي يمكنها استخدام المواد المستمدة من النبات كمصدر للطاقة لزيادة كتلة الخلية الميكروبية، وفي نفس الوقت تصنع منتجات ثانوية عديدة، ومع ذلك، فدور الكائنات المجهرية لم يقدر حق قدره عند بدء استخدامها لأول مرة في حفظ الأغذية وإنتاج المشروبات الكحولية، ولم يكتشف العالم الهولندي أنتوني فان ليفينهوك Antony van Leeuwenhoek البكتيريا إلا في القرن السابع عشر، وفي القرن التاسع عشر، أقنع العالم الفرنسي لويس باستير Louis Pasteur المجتمع العلمي بالدور الأساسي الذي تقوم به الكائنات المجهرية في التخمر fermentation، وعلى مدى العقود التالية، تم التعرف على منتجات الأيض الميكروبي microbial metabolism بمعدل سريع متزايد.

وفي بادئ الأمر، كانت المنتجات تأتي أساساً من المسارات الأيضية للميكروبات المنتجة للطاقة، وعلى سبيل المثال، يوفر المسار الحال للسكر، الإيثانول للمشروبات الكحولية، وثاني أكسيد الكربون لتخمير الخبز، وحمض اللبن لحفظ الأغذية (شكل ٣-١)، ومع نهاية القرن التاسع عشر، تم التعرف على أحماض عضوية أخرى مثل، حمض الخليك، وحمض البروبيونيك، وحمض الليمون بأنها منتجات للأيض الميكروبي products of microbial metabolism.



شكل ١-٣. المسار الحائل للسكر للتخميرات الكحولية، وفي هذا المسار، يتحول سكر الجلوكوز في عدة خطوات إلى حمض البيروفيك، الذي يتحول بعد ذلك إلى إيثانول، ويطلق ثنائي أكسيد الكربون.

وفي أوائل القرن العشرين، تبين أن العديد من المواد الكيميائية العضوية الأخرى منتجات من طاقة الأيض الميكروبي، وأثناء الحرب العالمية الأولى،

ابتكرت طريقة التخمير لإنتاج مزيبات الخلون والبيوتانول ، عندما كان الخلون يستخدم لإنتاج مفجر الكورديت(بارود عادم الدخان)، وظهر موقف مشابه خلال الحرب العالمية الثانية،عندما انقطع إمداد المطاط الطبيعي من منطقة الشرق الأقصى، وقد وجد الباحثون آنذاك أن ثاني وثالث البيوتانديول يمكن أن يتحول إلى أول وثالث بيوتاندين، الذى يمكن استخدامه فى صنع المطاط الصناعى، وفى ظهور مسار تخمير لصنع ثاني وثالث البيوتانديول .

ويمكن إرجاع بدايات الصناعة الدوائية الحديثة modern pharmaceutical industry إلى عام ١٩٢٨،عندما اكتشف ألكسندر فليمنج Alexander Fleming البنسلين penicillin،الذى كان أول مضاد حيوى ميكروبي يصنع بطريقة تجارية، ويعد البنسلين واحداً مما يسمى بالأيضيات الثانوية secondary metabolism،التي لا تعتبر من منتجات أيض الطاقة الميكروبية products of microbial energy metabolism، وبعد الحرب العالمية الثانية، تزايد عدد المنتجات المصنعة من عمليات التخمير الميكروبي بسرعة ليشمل سلسلة متكاملة من المضادات الحيوية والأحماض الأمينية لعلف الحيوان والإنزيمات، ويمكن تصنيف سلسلة المنتجات الضخمة التى يمكن صنعها من التخمير الميكروبي microbial fermentation، كما هو مبين بجداول ٣-٢.

جدول ٣ - ٢ تصنيف منتجات التخمير

Classification of fermentation products

الفئة	أمثلة
١ - منتجات نهائية لأيض الطاقة	إيثانول ، حمض خليك ، حمض اللبن ، بيوتانول ، خلون
٢ - عناصر تخزين الطاقة	جليسرول ، جليكوجين ، عديدات سكرية مختلفة
٣ - بروتينات إنزيمات خارج الخلية إنزيمات ضمن الخلية بروتينات غريبة	أميلازات ، سلولوزات ، بروتيازات ، إنزيم الجلوكوز النشوى ، البكتيناز أيزوميراز الجلوكوز ، ليجازات ، أوكسيداز الجلوكوز ، انفرتاز أنسولين ، هرمون النمو البشرى ، هرمون النمو البقرى
٤ - تركيبات الخلية	خميرة الخباز ، مبيدات حيوية حشرية ، بروتين من كائن وحيد الخلية ، مولدات المضادات
٥ - أيضيات بسيطة	أحماض أمينية ، حمض الليمون ، فيتامينات ، حمض المالك
٦ - أيضيات ثانوية	مضادات حيوية ، جبرلينات
٧ - مواد معدلة كيميائيا	سترويدات ، سوربوز ، جلوكوز

وخلال القرن التاسع عشر والنصف الأول من القرن العشرين ، كان الإنتاج الميكروبي مصدراً لمعظم الإنتاج العالمى من المواد الكيميائية العضوية ، وفى حين تعتبر المواد الخام عادة الدليل على اقتصاد المنتجات السلعية ، فينطبق هذا أيضاً على المواد الكيميائية العضوية ، وفى عام ١٩٢٠ ، شرعت شركة ستاندرد أول بنيوجرسى Standard Oil of New Jersey فى إنتاج المواد الكيميائية العضوية من البترول ، عندما بدأت تخليق كحول الإيزوبروبيل isopropyl alcohol من البروبلين propylene ، وعلى مدى العقود التالية ، وخاصة بعد عام ١٩٥٠ ، تزايد بسرعة استخدام المواد الأولية البتروكيميائية للتصنيع الكيميائى ، بسبب وفرتها ، وبسبب رخص أسعار البترول ، وارتفاع تكلفة المواد الخام المستمدة من النبات .

وعلى الرغم من وجود مسارات تخمير عديدة للمركبات العضوية، فقد تناقص تخمير بسرعة كمصدر لهذه المواد الكيميائية، مع أن البعض لا يزال يستمد -رجة كبيرة من عمليات التخمير الميكروبية، وتشمل عمليات التخمير هذه على إيثانول ethanol وعدد من الأحماض العضوية والمواد الكيميائية العضوية أكثر تعقيداً مثل، المضادات الحيوية، التي تتطلب خطوات تخليق متعددة.

ومع ذلك، فلم تغير أسعار البترول في حقبة السبعينات بشكل فجائي من تكاليف النسبية للمواد الخام للتخليق الكيميائي والتخميري فحسب، لكنها عززت أيضاً استقرار سوق البترول العالمي، ولهذا السبب، أصبحت المواد الأولية الزراعية مرة أخرى أكثر جذباً، ففي الولايات المتحدة على سبيل المثال، تم بسرعة إنشاء العوامل المساعدة على التخمير لإنتاج الإيثانول من لجلوكوز الذي يستمد من نشا الذرة، وشرعت البرازيل أيضاً في القيام ببرنامج ضخم لإنتاج الإيثانول بطرق التخمير، واستخدمت في هذه الحالة السكر من لمولاس.

ومع قدوم تكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم، التي ظهرت أيضاً في السبعينات، فقد أضافت بعداً جديداً آخر لاستغلال الأيض الميكروبي. ويمكن حالياً التوسع في سلسلة المنتجات التي تصنع من الخلايا الميكروبية، حيث تستخدم الكائنات العضوية كمصانع كيميائية مصغرة لتخليق بروتينات غريبة مثل الأنسولين البشري وهرمون النمو (انظر الفصل الرابع)، وقد تزيد تعديلات جينية أخرى من كفاءة عمليات التخمير الحالية، أو تعطي الميكروب القدرة على النمو على مصادر طاقة لم تكن مستخدمة من قبل.

المذيبات الصناعية

Industrial solvents

لا يزال يستمد حوالي ٨٠% من الإيثانول المنتج في العالم من عمليات التخمير، ويأتي الجزء المتبقى إلى حد بعيد من عمليات التخليق من المنتج البترولي الإيثيلين، ويستخدم الكحول المنتج في الولايات المتحدة في المقام الأول في المشروبات الكحولية (جدول ٣-٣) ، بيد أن هذا الوضع لا يوجد دائماً في كل مكان في العالم، فقد عكفت البرازيل على برنامج كبير لإنتاج الإيثانول للحصول على الوقود، وبذلك خفضت وارداتها البترولية، واعتباراً من عام ١٩٨٤، أنتجت البرازيل ٧,٩ مليون طن تقريباً من عمليات التخمير، وحصلت على السكرز كمصدر كربوني من قصب السكر.

جدول ٣-٣. إنتاج تخمر الإيثانول في الولايات المتحدة الأمريكية

U.S fermentation production of ethanol ١٩٨٤

المنتج	الإنتاج السنوي (مليون طن إيثانول)
البيرة	٢,٢
كحول وقود	١,٦
مشروبات كحولية مقطرة	١٠
نبيذ	٠,٥
المجموع	٥,٤

وتزيد الولايات المتحدة من إنتاج كحول الوقود أيضاً بدرجة كبيرة ، ويرجع ذلك أساساً إلى الزيادة السريعة في أسعار البترول خلال فترة السبعينات، والطلب المتلاحق للبحث عن مصادر طاقة بديلة، وفي الآونة الأخيرة، عندما تزايد

معرض العالمى من البترول ولو بصورة مؤقتة ، تم تدعيم برنامج الوقود تحوّلنى بسبب الخفض الشديد الذى طالبت به لجنة فيدرالية لمحتوى الرصاص فى بترول ، وقيمة الإيثانول كمعجل للأوكتان .

ويمكن لعدد من الكائنات المجهرية أن تحول الجلوكوز فى غياب الأكسجين إلى منتجات ثانوية من أيض الطاقة ، التى تشمل بشكل نمطى على كحوليات مثل الإيثانول والأيزوبروبيل والبيوتان وأحماض عضوية قصيرة السلسلة مثل ، حمض الفورميك ، والخليلك ، واللين ، والبروبيونيك ، والزبدى ، والمنتجات الأخرى التى يمكن إنتاجها هى : ٢ و ٣ - بيوتانديول والخلون .

ويمكن لمعظم الكائنات المجهرية التى لديها القدرة على الأيض اللاهوائى إنتاج الإيثانول ، غير أن العديد منها لا يستطيع أن ينتج مقادير كبيرة لأنها : يمكنها تتحمل التأثيرات السمية للكحول على غشاء الخلية ، بيد أنه يمكن بعض الكائنات المجهرية أن تجمع تركيزات من الإيثانول ، وبدراسة تاريخية ، كن الميكروب الأكثر استخداماً هو الخميرة - الفطرية السكرية الجعوية *Saccharomyces cerevisiae* - التى يمكنها إنتاج إيثانول تصل نسبته إلى ١٠% من حساء التخمر ، وتستطيع هذه الخميرة أن تنمو على سكريات بسيطة مثل ، الجلوكوز وعلى سكروز السكر الثنائى المعروف بسكر المائدة ، ومن المعروف أن الفطر السكرى مادة آمنة الاستخدام كإضافة للغذاء للاستهلاك الأمنى ، وعلى ذلك تعتبر مادة مثالية لإنتاج المشروبات الكحولية ولإنتاج الخبز .

وفى المسار الأيضى الذى ينتج الإيثانول ، تحول الخميرة أحد جزئيات الجلوكوز إلى جزيئين من الكحول ، بالإضافة إلى جزيئين من ثانى أكسيد

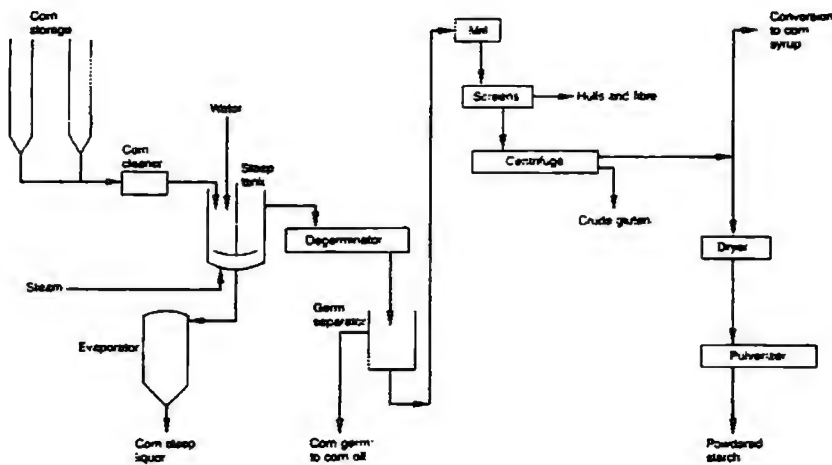
الكربون (شكل ٣-١). ويكتسب الكائن المجهرى أيضاً جزيئين من وسيط الطاقة، ثالث فوسفات أدنوسين (ATP)، التى يستخدمها للحفاظ على الأنشطة الخلوية الأخرى، وإن لم تنتج كتلة خلوية أخرى، فسيتحول ٥١% من الجلوكوز إلى كحول، ومع ذلك، فإن الناتج الفعلى يكون قريباً من ٤٥%، لتحول بعض الجلوكوز إلى كتلة خلوية، ونواتج ثانوية مثل، الجليسرول.

وعلى الرغم من أن الإيثانول ينتج أساساً من الجلوكوز والسكرورز، إلا أنه يمكن استخدام سلسلة كبيرة من السكريات الأخرى، ويمكن الحصول على السكريات من أنواع عديدة من المواد الخام، ويعتبر قصب السكر وبنجر السكر من أكثر المصادر المعروفة للسكرورز، فى حين تعتبر أية مادة نباتية محتوية على النشا، ويعتمد ذلك على أسعارها ومحتواها النشوى، مرشحة ممكنة لأن تتحول إلى جلوكوز، وتعتبر الفاكهة أيضاً مصادر للجلوكوز والفركتوز، كما هو الحال فى إنتاج أنواع النبيذ المصنوع من الفاكهة، وفى الولايات المتحدة، تعد الذرة المصدر النشوى المفضل لإنتاج كحول الوقود، ويستخدم مزيج من الحبوب - القمح والذرة والشيلم والشعير - لصنع البيرة والمشروبات الروحية المقطرة، ويعتبر المولاس مصدر السكر لإنتاج المشروبات الكحولية المعروفة بالرم.

وعلى الرغم من توجيه قدر كبير من النشاط البحثى نحو تطوير السلولوز كمادة خام للتخمير، إلا أنه لم يبرهن بعد على أنه المادة الأرخص سعر الكى تتنافس السكريات والنشويات، وقد استخدم اللاكتوز المستخرج من ماء الجبن أيضاً كمادة خام، ومرة أخرى كان نجاحه محدوداً، فلا يوجد ما يكفى منه للعمليات الإنتاجية الكبيرة، ولا توجد أنواع الخميرة التى يمكنها استخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة وتحمل تركيزات الكحول العالية، وعلاوة على ذلك،

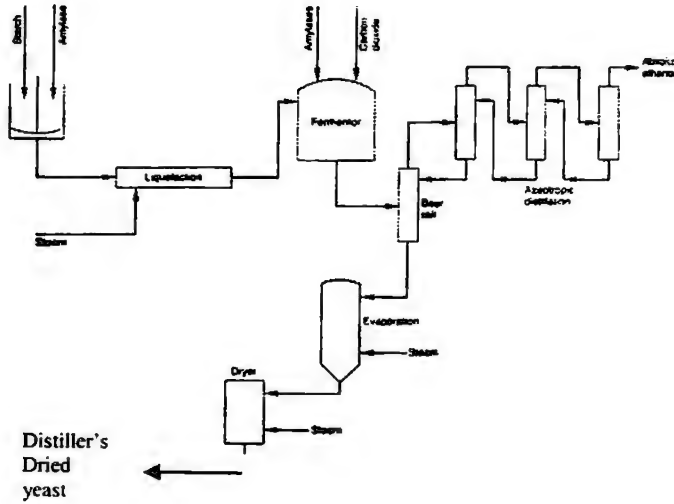
يحتوى ماء الجبن على تركيزات عالية من المعادن المذابة التى تتجج فى إعاقه عملية التخمر.

وعندما تستخدم الذرة كمصدر للنشا لإنتاج كحول الوقود، يجرى أولاً نزع الجنين حتى يمكن استخلاص زيت الذرة والبروتين للاستفادة بهما، وعلى سبيل المثال، ففي عملية الطحن الرطب للذرة، يجرى نقع الحبوب لمدة يومين فى الماء (شكل ٢-٣)، وبعد ذلك تكسر الذرة الرطبة فى جهاز تكسير نازع للجنين، ويفصل الجنين بواسطة التعويم. وتترسب بقية الذرة فى القاع، وتزال الألياف والقشرة الخارجية بطريقة الفصل، وتفصل النشا بعملية الطرد المركزي، ويجرى تمهئة التيار المتدفق المحتوى على بروتين الجلوتين، ويجفف المتبقى لبيعه فى صورة علف حيوانى، ويستخلص النشا بواسطة الترشيح الخوانى، وقد يجرى تجفيفه قبل بيعه أو تجرى عليه عملية تشغيل أخرى لتحويله إلى سكريات قابلة للتخمر.



شكل ٢-٣ رسم تخطيطى لعملية الطحن الرطب للذرة. المخطط مشروح بالنص

ولإنتاج الإيثانول ، يجرى تسييل زبد النشا عند درجة حرارة ٩٠ درجة مئوية بواسطة إنزيمات ألفا أميلاز التى يمكنها تحمل درجات الحرارة العالية (شكل ٣-٣). ويتم التحول إلى سكريات عند درجات حرارة منخفضة باستخدام إنزيمات جلوكو أميلاز ، ويتحول ما يقرب من ٩٨% من النشا إلى سكريات قابلة للتخمر عن طريق هذه المعالجة ، وبعد ذلك يجرى تخمير السكريات لإنتاج الإيثانول بواسطة سلالات صناعية من الفطريات السكرية الجعوية .



شكل ٣-٣ رسم تخطيطى للتخمر الصناعى للسكر إلى إيثانول ، المخطط مشروح بالقص .

ويجرى استخلاص ثانى أكسيد الكربون المنتج من تفاعل التخمر بواسطة معدة تعمل بكفاءة عالية لبيعه كمنتج ثانوى ، وبعد اتمام التفاعل ، يجرى فصل الخميرة والمواد الصلبة الأخرى من حساء التخمر بواسطة الطرد المركزى ، وتجفف لبيعهها فى صورة علف حيوانى ، وينقل

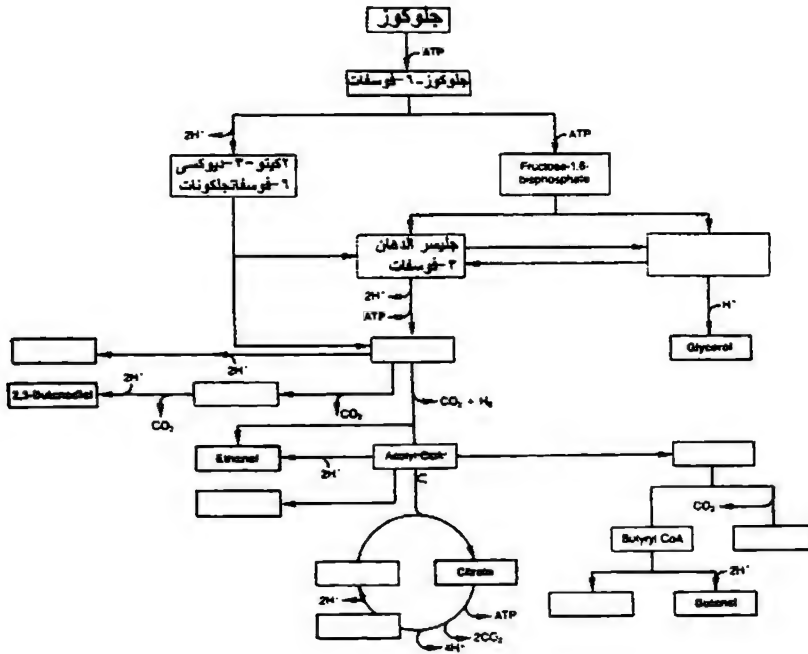
الحساء المصفى إلى معمل تقطير البيرة من أجل استخلاص الإيثانول وتركيزه جزئياً ، وهناك تقطير آخر يجرى فى عامود تقطير مقوم يصل بتركيز الإيثانول إلى نسبة ٩٥% ، وهى أقصى نسبة يمكن الحصول عليها من تقطير محلول مائى ، وبعد ذلك ، يزال الماء المتبقى من التقطير الجزئى بواسطة مذيّب آخر مثل ، البنزين ، وبذلك ينتج كحولا نقياً ، يمكن مزجه بسهولة فى بترول عالى الأوكتان ، أو يستخدم كمذيب صناعى .

ويحول تخمر الخلون - بيوتانول مواد خام عديدة إلى مانتين كيميائيتين صناعيتين مفيدتين وإيثانول كمنتج ثانوى ، ويمكن استخلاص الهيدروجين وثانى أكسيد الكربون أيضاً كمنتجات ثانوية من معدة إنتاجية عالية الكفاءة ، والسلالة البكتيرية الأكثر اسخداماً لإنتاج الخلون والبيوتانول ، هى المثبطات الخليحية *Clostridium acetobutylicum* اللاهوائية الكاملة ، فى حين أنه تستخدم المثبطات الحيوية *C. butylicum* بدلاً منها ، وعلى ذلك ، لا يمكن حدوث التخمر إلا فى الغياب التام للأكسجين .

وقد تبدأ عملية تخمر الخلون - البيوتانول بمراد أولية ، مثل المولاس والنشا والسلولوز وماء الجين (الشرش) ، أو سائل الكبريت الناتج من صناعة الورق كمصادر للجلوكوز ، وتتفع البكتيريا من وجود مصادر نتروجينية معقدة تحتوى على البروتين والفيتامينات بالإضافة إلى مصدر جلوكوزى ، وعلى الرغم من أن وجبة الذرة تعد وجبة نموذجية لاحتوائها على النشويات والبروتينات والفيتامينات ، إلا أنه يفضل المولاس ونقيع الذرة للعمليات التجارية بسبب رخص أسعارهما .

ويتطلب إنتاج الإيثانول المصنع من الفطرية السكرية الجعوية ، أن يجرى أولاً تميئة النشويات إلى جلوكوز بواسطة الإنزيمات ، ومع ذلك ، يمكن لأنواع

المثبطات Clostridium species أن تقوم بهذا التحويل بنفسها، لأنها تنتج وتفرز أثناء نمو الخلية إنزيمات الأميلاز، وبمجرد أن ينطلق الجلوكوز من المادة الخام بواسطة الإنزيمات البكتيرية فإنها تدخل المسار الحال للسكر، حيث تنتج البيروفات وإستيل كوانزيم مع انطلاق غازى ثانى أكسيد الكربون الهيدروجين (شكل ٣-٤)، وتكمل المرحلة الأولى من التخمر بتحول البيروفات والإستيل كوانزيم إلى الحمض الزبدى وحمض الخليك.



شكل ٣-٤. التفاعلات التي يتضمنها تخمر الجلوكوز إلى بيوتانول وخليون، يحول المسار الحال للسكر الجلوكوز إلى بيوفرات، التي تتحول حينئذ إلى أستيل كوانزيم، ويتحول الأستيل كوانزيم بالتالى إلى عدة منتجات تشمل الخليون، والبيوتانول، بالإضافة إلى عدة أحماض عضوية.

وفى المرحلة الثانية، تتحول الأحماض المختلطة إلى المذيبات المختلطة من البيوتانول والخليون والإيثانول، التي توجد بنسب نهائية حوالى: ٦٠ إلى ٣٠ إلى ١٠،

وتنتهى عملية التخمير بعد حوالى ٣٦ ساعة ، عندما يصبح تركيز الإيثانول عاليًا بدرجة كافية لتمزيق غشاء الخلية وإيقاف التفاعلات ، ويتم هذا عندما يصل تركيز البيوتانول ١٢ جرام لكل لتر من حساء التخمير ، وفى نهاية عملية التخمير فان عملية تحول المواد الوسيطة إلى بيوتانول لا تكتمل ، فى حين تبقى سلسلة من المواد الوسيطة (جدول ٣-٤) ، ولما كانت المواد الصلبة المتبقية من حساء التخمير غنية بفيتامين ريبوفلافين ، فمن الاقتصاد استخلاصها لى تباع كعليقة حيوانية غنية بالبروتين .

جدول ٣-٤ . المنتجات النهائية لتخمير الخلون-بيوتانول*
End-products of the acetone-butanol fermentation

المنتج	للمنطبات الخلوية	للمنطبات الحبيوية
بيوتانول	٢٣	٢٤
خلون	٧	-
إيثانول	٢	-
ثنائى أكسيد الكربون	٥٤	٥٠
هيدروجين	٢	١
حمض خليك	٥	٦
حمض زبدى	٢	٨
أستون	٣	-
أيزوبروبانول	-	٤

* يعبر عن النواتج بالجرامات المنتجة من كل ١٠٠ جرام من الجلوكوز المستهلك.

الأحماض العضوية

Organic acids

يمكن إنتاج سلسلة من الأحماض العضوية عن طريق التخمير الميكروبي، وفيما عدا الكحول، كانت هذه الأحماض العضوية هي منتجات التخمير fermentation production الأولى، والمثال التقليدي هو حمض الخليك في صورة الخل، وخلال منتصف القرن التاسع عشر، بدأ إنتاج الحمض بطريقة صناعية لاستخدامه كمادة كيميائية بسيطة، وتبع ذلك تطوير عمليات تخمر لصناعة أحماض البروبيونيك والجلوكونيك والليمون واللبن، وفي بداية القرن العشرين، أضيفت أحماض الفيومريك والماليك والإيتاكونيك والأكسوجلوكونيك إلى قائمة منتجات التخمير، وظهرت أيضاً عملية تخمر حمض الطرطريك، غير أن هذا الحمض أنتج تجارياً كمنتج ثانوي من عمليات تخمر النبيذ.

ومن الأحماض العضوية الأخرى، يعتبر حمض الليمون citric acid منتج التخمير الرئيس حالياً، على الرغم من أن كميات لا بأس بها من أحماض اللبن والجلوكونيك والإيتاكونيك لا تزال تنتج أيضاً من عملية التخمير، ويمكن الحصول على حمض الفيومريك والتفاح، أما بواسطة التخمير أو بواسطة التخليق العضوي، ويتوقف ذلك على تكلفة المواد الأولية، ويتم إنتاج هذين الحمضين حالياً عن طريق عملية الأزمرة والإماهة لحمض الماليك maleic acid، الذي يصنع بدوره بواسطة الأكسدة الحفزية للهيدروكربونات التي أساسها البترول، وبسبب المتطلبات التنظيمية، فلا يزال ينتج حمض الخليك في صورة خل بواسطة عملية التخمير، في حين يجري صنع المستوى الصناعي من

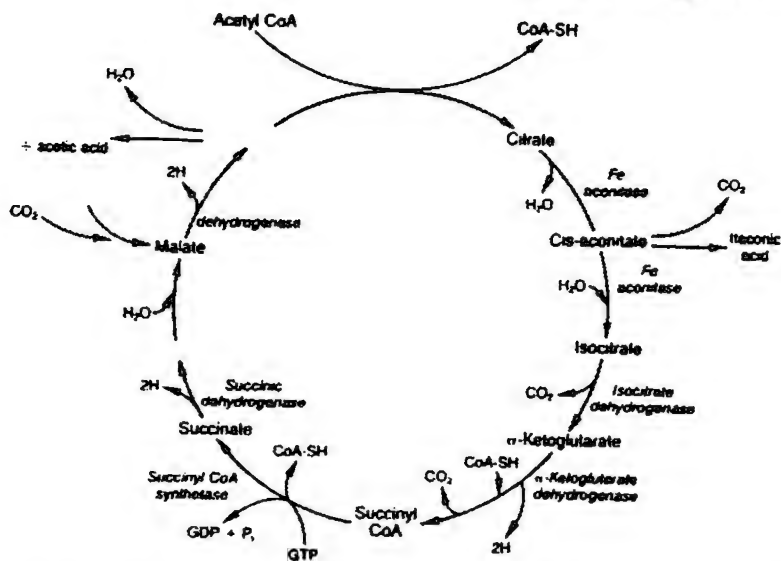
الحمض بواسطة عمليات الأكسدة الحفزية للمواد البتروكيميائية ذات الوزن الجزيئى المنخفض، أو بواسطة عملية الحفز الكربونولى للميثانول .

ويستخدم حمض الليمون على نطاق واسع فى الأغذية والمشروبات لإكساب مذاق الحمض والنكهة، ويستخدم صناعياً كعنصر محسن من فاعلية المنظف، وكمستخلب chelator للمعادن، وكمقاوم للأكسدة. وحتى عام ١٩٣٠، كان يجرى إنتاج الحمض من الفاكهة الحمضية، وبخاصة فى إيطاليا، على الرغم من أن هناك مصدر بديل، ألا وهو التخمير بواسطة الفطريات قد اكتشف فى أواخر القرن التاسع عشر. وعلى مدى العقود التالية من تطوير عملية التخمير، اكتشفت أجناس عديدة من الفطـور تضمنت على الرشاشيات *Aspergillus*، والعفن *Penicillium*، و *paecilomyces*، والعفنة *Mucor*، و *ustilin* لإنتاج هذا الحمض، وفى الآونة الأخيرة، وجد أن معظم الخمائر والعديد من البكتيريا منتجة جيدة لهذا الحمض.

وقامت شركة فايزر بمدينة جروتون Pfizer Inc. of Groton بولاية كونتى الأمريكية بتحسين إنتاج التخمير لحمض الليمون ، وأنتج بشكل تجارى فى عام ١٩٢٣، وبعد ذلك أصبحت عملية التخمير السريع العملية الأقل تكلفة وغمرت السوق العالمى، وحالياً، يحتاج السوق العالمى من حمض الليمون ما يقدر بحوالى ألف طن متري، وتقوم شركة فايزر بإنتاج نصف هذه الكمية، وتنتج معامل مايلز بمدينة إيلكهارت بولاية إنديانا الأمريكية ربع المنتج الكلى.

ويخلق حمض الليمون بصورة طبيعية كمادة وسيطة فى دورة حمض الكربوكسيل الثلاثية، وهى أحد مسارات الخلية الرئيسة لإنتاج الطاقة (شكل ٣-٥). ويضاف الكربون إلى الدورة فى صورة أسيتيل

كوانزيم acetyl CoA من المسار الحالى للسكر، ونتيجة لذلك فإن أى مصدر كربونى يمكن أن يدخل عملية هدم الجلوكوز يمكن استخدامه لإنتاج حمض الليمون . كانت معظم المصادر الكربونية المعروفة سكريات منخفضة التكلفة مثل السكريات الموجودة فى مولاس البنجر والقصب ، وفى الآونة الأخيرة ، اتضح أن المواد الهيدروكربونية التى تتأكسد بأنواع من الخمائر Candida إلى إستيل كوانزيم مصادر كربونية جذابة من الناحية الاقتصادية لاستخدامها فى عملية التخمير .



شكل ٣-٥ دورة حمض ثنائي الكربوكسيل ، تعتبر هذه الدورة أحد مسارات الخلية الرئيسية لإنتاج لطاقة ، والخطوة الأولى ، هى تخليق ملح حمض الليمون من إستيل كوانزيم ، وتتطلب الخطوة التالية ، وهى تحويل ملح حمض الليمون إلى cis - aconitate عامل الحديد المساعد ، (Fe)، وفى الإنتاج الصناعى لملح حمض الليمون توجّه الخطوات عادة إلى إزالة أيونات الحديد من خليط التخمير لمنع cis-aconitate ومن ثم تحسن نواتج حمض الليمون .

كان حمض الليمون ينتج فى الأصل فى أطباق المزرعة بواسطة الفطور النامية على سطح خليط التخمير، وكان يضاف الأكسجين بواسطة الانتشار الحر،

ومع ذلك، يعطى غمر الفطر فى الحساء فى خزان تخمير مزود بالهواء معدلات إنتاج عالية ، ويعتبر حاليا الطريقة المفضلة ، والفطر *Aspergillus* ، الذى كان مستخدماً منذ بدء إنتاج حمض الليمون ، لا يزال الفطر المفضل عندما تكون الركيزة من السكر .

وأظهرت الأبحاث الأولى على تطوير عملية التخمير الحاجة إلى ركائز نقية للحصول على إنتاج عالى من حمض الليمون وعادة ما يكون للأيونات المعدنية التى تلوث الركائز تأثير ضار ، وهذا ما ينطبق على الحديد بشكل خاص ، الذى يحفز على نمو الخلايا الميكروبية على حساب إنتاج حمض الليمون ، ويعد الحديد مطلوب من أجل النمو ، غير أن التركيز المثالى فى التخمير يكون فى حدود ٠,١ إلى ١٠ أجزاء فى المليون ، ويتوقف ذلك على السلالة الميكروبية المستخدمة ، ولا تنتج السترات عادة بشكل مفرط ويطلقها الكائن المجهرى ، ويؤدى العجز فى الحديد إلى إيقاف دورة حمض ثلاثى الكربوكسيل *tricarboxylic acid cycle* عند الخطوة التى تتحول فيها السترات إلى *cis-aconitate* ، ونتيجة لذلك ، تتراكم السترات ، وللعمل على زيادة الناتج من حمض الليمون ، يجرى التخلص من السكريات بواسطة التبادل الأيونى .

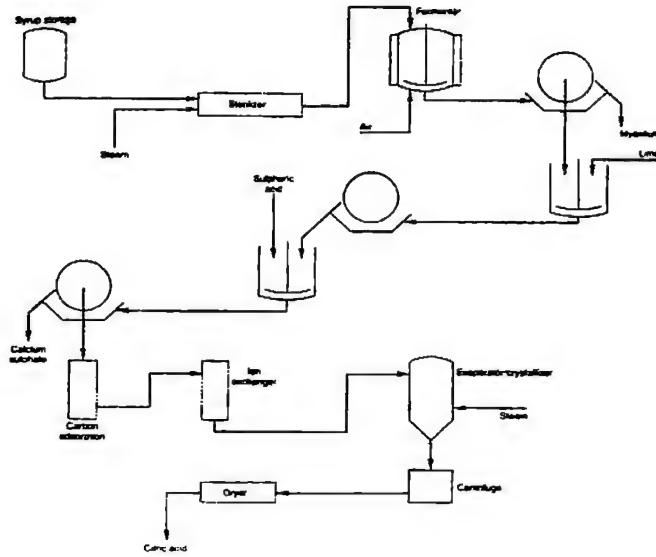
ومع ذلك ، يمكن لإضافات أخرى أن تخفف من تأثيرات الحديد السلبية ، فسيانيد حديد البوتاسيوم يشكل ترسيبات من المعادن النزرة ، ويقلل تركيزاتها فى وسط التخمير ، والتركيز المثالى لسيانيد حديد البوتاسيوم لإنتاج حمض الليمون ، هو فى حدود ٠,١ إلى ١ جرام فى اللتر ، ويتوقف ذلك على محتوى المعدن النزر ،

فى البداية، وبالإضافة إلى ذلك، تحفز كحوليات مثل، الميثيل، والإيثيل والإيزروبيل على إنتاجية حمض الليمون عندما تستخدم بتركيزات تتراوح ما بين ١% إلى ٤ %، والتركيزات الأعلى تكون سامة لنمو الخلية الأمر الذى يؤدى إلى تقليل الإنتاجية، ويمكن للنحاس أيضا معادلة تأثير الحديد، ويحتمل أن يكون ذلك من خلال إعاقته للإنزيم، الذى يحول السترات إلى أكونيتات aconitate، ويمكن لتركيز نحاس ذى ٥٠٠ جزء فى المليون أن يعادل ما يقرب من ١٠ أجزاء فى المليون من الحديد.

وفى البداية يعالج الشراب المحتوى على السكر المستخدم فى العملية المغمورة لإنتاج حمض الليمون بواسطة تبادل أيون راتنجى موجب الشحنة لإزالة الحديد، وبعد ذلك يعقم ويلقم للمخمر، الذى يكون قد عقم تماماً (شكل ٣-٦)، ويجرى إدخال محلول مائى من المواد الغذائية، الذى تم تعقيمه أيضاً إلى المخمر لإمداد التفاعل بالأمونيا والفوسفات والمعادن الأخرى غير الموجودة فى الشراب.

ويتم ضبط الأس الهيدروجينى فى المخمر فى المدى من ٥ إلى ٦، عندما يكون المولاس هو الركيزة، وأقل من ٣ عندما تستخدم صور أنقى من السكر، وبعد أن تصل درجة حرارة المخمر إلى ٣٠ درجة مئوية، يتم تطعيم محتويات المخمر بالفطر *Aspergillus niger*، ويسمح لعملية التخمر بأن تستمر لمدة تتراوح ما بين أربعة إلى خمسة أيام، وخلال تلك المدة يتحول ما بين ١٢٠ إلى ١٥٠ جرام لكل لتر من السكر إلى ما بين ١٠٠ إلى ١٤٠ جرام من حمض الليمون، وللحصول على أعلى إنتاجية، فإنه يجب الإبقاء على تهوية كافية للحفاظ على سلامة الميكروب نتيجة لنقص الأكسجين.

وفى نهاية عملية التخمير يتم ترشيح حساء التخمير، ويعالج بعد ذلك بالجير نرفع الأس الهيدروجيني، وإزالة ترسيب ملح الكالسيوم من حمض الليمون، وينتقل الراسب من الروبة بالترشيح ويعاد إذابته بواسطة حمض الكبريتيك، وبذلك ينتج راسب من كبريتات الكالسيوم، التى تزال بواسطة خطوة ترشيح أخرى، ويعالج حمض الليمون المحمض بواسطة كربون منشط لإزالة الشوائب الملونة وبواسطة التبادل الأيوني لإزالة الكالسيوم المتبقى والكاتيونات الأخرى، ويتبلر حمض الليمون عند تركيزه فى مبخر، وبعد ذلك تستخلص البلورات من مرشح طارد مركزى ويجفف فى مجفف أتوني دوار.



شكل ٣-٦. رسم تخطيطي لتصنيع حمض الليمون. المخطط مشروح بالنص.

وأحماض اللبن والإيتاكونيك والجلوكونيك، وهى الأحماض التجارية الباقية التى لا تزال تصنع بكميات كبيرة بواسطة التخمير، يتم إنتاجها جميعاً بطريقة مماثلة لتخمير حمض الليمون، وتستخدم أنواع من فطر *Aspergillus*، فيما عدا

حالة حمض اللبن، الذى ينتج بدلاً من ذلك بواسطة أنواع من *Lactobacillus* أو *Streptococcus*، وتتم عمليات التخمير إما بالمولاس كمصدر للسكر أو النشا كمصدر للجلوكوز، وتصل تركيزات المنتج فى الحمض العضوى بشكل عام فى حدود من ٥ إلى ١٠% بالوزن، وعلى الرغم من أن حمض اللبن ينتج فى غياب الأكسجين، فإن جميع عمليات التخمير الأخرى تحتاج إلى الأكسجين للحصول على إنتاجية عالية، ويجرى استخلاص أحماض اللبن والإيتاكونيك والجلوكونيك وتتقبتها بطرق مماثلة للطرق المستخدمة مع حمض الليمون.

الأوجه الاقتصادية للتخمير

Economic aspects of fermentation

يمكن اعتبار الكائنات المجهرية معامل كيميائية ميكروسكوبية، تقوم بامتصاص المواد الخام وتخلق أثناء تكاثرها منتجات كيميائية، وغالباً ما تصل كفاءة العمليات داخل الميكروبات إلى حوالى ١٠٠%، مع إنتاج قليل من المنتجات الثانوية غير الأساسية.

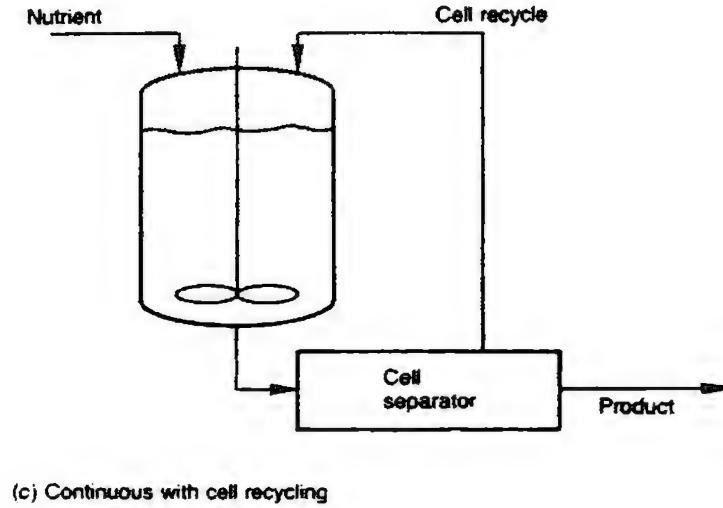
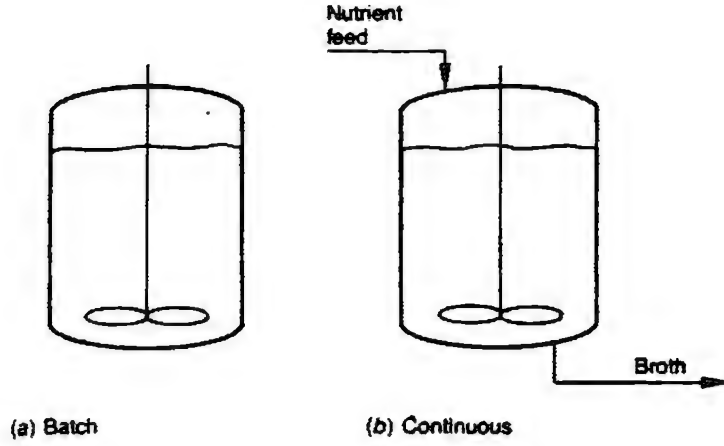
وعلى مدى السنين، تغيرت التكنولوجيا التى تستخدم هذه المعامل الكيميائية الميكروبية تغيراً ملموساً، حيث كانت خلال النصف الأول من القرن العشرين تكنولوجيا بسيطة تماماً، وتضمنت عمليات التخمير الأولى الإنتاج غير الهوائى للمذيبات فى قنور كبيرة، وحتى هذه الأيام، فغالباً ما ينتج الكحول الصالح للشرب فى خزانات خشبية سعة ٢٠ ألف جالوناً، وذات فتحات علوية، ولا توجد بها أجهزة لمراقبة سير تفاعل التخمير، وفى البداية، كانت تجرى التخمرات الهوائية فى مزارع من الأطباق، وتنمو على سطحها الكائنات المجهرية على

طبقة من الحبوب أو منتجات من الحبوب ، وكان يجرى إنتاج أحماض الخليك والجلوكونيك فى قواعد من الخشب المسحوج بجعل حساء التخمر ملامسا للهواء.

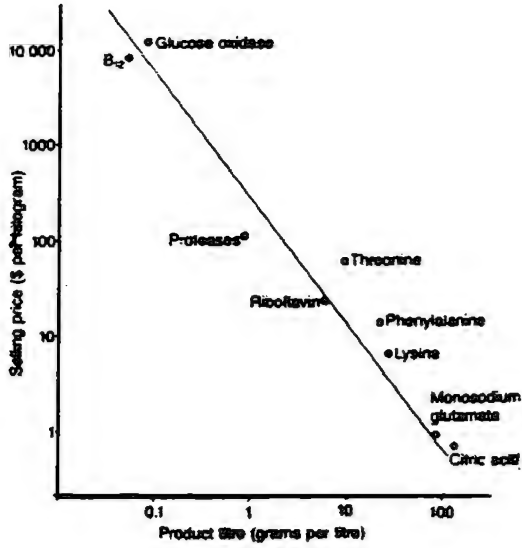
ومع ذلك، فقد أدى إنتاج الخميرة بكميات كبيرة إلى ظهور أوعية التخمر الكبيرة التى يمكن إدخال الهواء إليها، وبمجرد أن ظهرت أهمية البنسلين أثناء الحرب العالمية الثانية، أدى الإنتاج التجارى من هذا المضاد الحيوى إلى إدخال الهندسة الكيميائية الحديثة فى تكنولوجيا التخمر، وحينذاك كانت تصمم أوعية التخمر بشكل روتينى من أجل التعقيم والتحكم فى الأس الهيدروجينى ودرجة الحرارة، على الرغم من أن عمليات التخمر كانت لا تزال تتم "بنظام العبوة" batch mode (شكل ٣-٧).

وفى هذا النوع من العمليات يجرى تعقيم الوعاء ومحتوياته من المادة الغذائية، ويتم إدخال مادة التلقيح الناضرة من خلايا سريعة النمو، بحيث يتراوح حجم الخلية فى حدود من ١ إلى ١٠ من محتويات الوعاء الكلية، وبالنسبة للتخميرات الهوائية، فإنه يجرى قلب الوعاء وإدخال الهواء المرشح، وبعد فترة نمو تصل من ٢ إلى ٥ أيام، يتم تفريغ حساء التخمر ويرشح للتخلص من الكتلة الخلوية والمواد الصلبة قبل استخلاص المنتج وتنقيته، وفى الآونة الأخيرة، تم تطوير عمليات التخمر لتشمل النوع المستمر، إما بإعادة تدوير الخلايا أو بدونها، ويؤدى ذلك إلى تشغيل المزيد من المادة لكل وعاء مع إنقاص مماثل فى التكاليف الرأسمالية، وأصبح إنتاج المواد الكيميائية بمقادير كبيرة مثل الإيثانول يسيراً بدرجة كبيرة من خلال استخدام النظام المستمر مع تدوير الخلية.

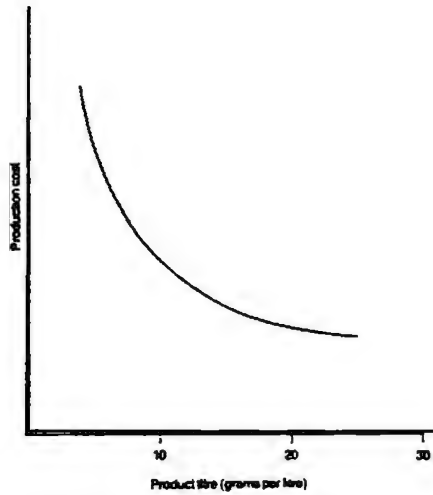
والعوامل الرئيسة التي تؤثر على تكاليف الإنتاج، هي إنتاجية التخمر، أى العيار الحجمى للمنتج product's titre (تركيز حساء التخمر) لكل دورة زمنية، والناجح من المصدر الكربونى، وسهولة استخلاص recovery المنتج وتنقيته، ولما كانت الدورات الزمنية لمعظم التخمرات تتراوح ما بين يومين إلى ثلاثة أيام، فإن الإنتاجية تتأثر بدرجة كبيرة بالعيار الحجمى للمنتج، وعلى مدى سجل أداء أربع دورات، يمكن أن تنسب بصورة مباشرة أسعار سلسلة كبيرة من منتجات التخمر إلى تركيز المنتج فى حساء التخمر (شكل ٣-٨)، ويكون التأثير قوياً بصفة خاصة فى التركيزات الأقل من ٠,١% . وأعلى من تركيز ١%، تعتمد تكاليف الإنتاج بدرجة أكبر على المتطلبات الخاصة للمنتج الخاص، ومثال على ذلك، هو تكلفة التخمر لإنتاج حمض أمينى، فعندما يزداد العيار الحجمى لأكثر من عشرة جرامات للتر، يكون له تأثير متضائل على تكلفة الإنتاج (شكل ٣-٩).



شكل ٧-٣. ثلاثة أنواع من عمل المخمر، في نظام العبوة (أ) تمزج الكائنات المجهرية والمواد الغذائية الأساسية في المخمر إلى أن يصل التفاعل إلى درجة الكمال المطلوبة، وفي تلك الفترة، تسحب محتويات الوعاء ويستخلص المنتج، وفي النظام المستمر (ب) يجري إضافة محلول المادة الغذائية ببطء في المخمر، بينما يجري سحب حساء التخمر والمنتج ببطء. وتسمح بعض الصليبت للخلايا التي تزال مع الحساء بإعادة تدويرها مرة أخرى في المخمر (ج).



شكل ٨-٣. تأثير العيار الحجمي على سعر البيع، كلما كان تركيز المنتج عالياً في حساء التخمر، انخفض سعر البيع.



شكل ٩-٣. تأثير العيار الحجمي للمنتج على تكاليف إنتاج حمض أميني، ينخفض السعر بسرعة إلى أن يصل العيار الحجمي ١٠ جرامات في اللتر، وبعد ذلك يصبح للزيادات الأخرى تأثير ضئيل على السعر.

وهناك عامل تكلفة مهم ثان ، هو غلة المنتج من المصدر الكربوني ،التى تصل بشكل نموذجى فى حدود من ٢٠% إلى ٦٠% من تكلفة الإنتاج الكلية ، وعلى ذلك ، فإن النواتج العالية أمر بديهي للحفاظ على تقليل هذه التكاليف ، وهذا ما ينطبق بشكل حقيقى على المواد الكيميائية الأقل تكلفة ، ويوضح تحليل تكاليف التخمير لحمض عضوى نموذجى لحصيلتين إنتاجيتين مختلفتين ، أن تكلفة المادة الخام تتخفض بدرجة كبيرة كلما ارتفعت غلة المنتج product yield والعيار الحجمى titre (جدول ٣-٥) . بيد أن نسبة المجموع تظل فى الغالب دون تغير ، وتنخفض أيضا تكاليف الخدمة بشكل ملحوظ ، لأن الناتج الأعلى يؤدى إلى نقص كبير فى حجم المخمر .

جدول ٣ - ٥ تحليل سعر منتج التخمير

الإنتاج السنوى : خمسة مليون رطل

مصدر الكربون : الجلوكوز

العيار الحجمى :		١٠ جرامات / لتر		٤٠ جرام / لتر	
غلة المنتج % :		٣٠%		٦٣%	
مواد خام	١,٥٥	٤٥	٠,٩٣	٤٣	
خدمات	٠,٦١	١٧	٠,٢٠	٩	
عمالة	٠,٧٩	٢٣	٠,٧٩	٣٦	
رأس مال	٠,٥٣	١٥	٠,٢٧	١٢	
المجموع	٣,٤٨			٢,١٩	

(*) منتج منتجا لكل وحدة جلوكوز مستخدم ، كنسبة من الحد الأقصى النظري

ويمكن أن تتفاوت تكاليف الاستخلاص والتقية بدرجة كبيرة، ويتوقف ذلك على المنتج، وبعض المنتجات مثل إنزيم أميلاز المتحلل بالماء، على سبيل المثال، تستخلص ببساطة عن طريق إزالة كتلة الخلية من حساء التخمر، ولا تحتاج إلى تقية إضافية، ومنتجات أخرى، مثل البروتينات التي توجه نحو الاستخدام العلاجي للمرضى، تحتاج إلى تقية دقيقة للتخلص من العوامل الملوثة.

أما بالنسبة لمنتج سلعى بسيط مثل حمض عضوى، فقد تصل تكاليف الاستخلاص والتقية إلى حوالى نصف التكلفة الرأسمالية الاستثمارية ، وحوالى نصف تكاليف التشغيل، ومواد كيميائية صناعية أخرى، تتضمن على الكحول الصرف، الذى يجب أن يقطر، تكون نصف تكاليفه الكلية مرتبطة بعمليات الاستخلاص والتقية، وتتأثر هذه العمليات بشدة بحجم المعدات، وعلى ذلك يمكن تحقيق وفر كبير فى التكلفة الفعلية من خلال زيادة طاقة الإنتاج القصوى.

وابتليت صناعة التخمر منذ البداية بعدد من المشاكل ، وأهم هذه المشاكل السائدة والمعوقة مشكلة التلوث الميكروبي، فبمجرد أن يصيب كائن مجهرى مهاجم عبوة التخمر، تنخفض غلة المنتج، وقد تصل جويته إلى درجات غير مقبولة، وقد تصبح النتيجة فقد تام لعبوة التخمر الملوثة، ويمكن أن يمثل ذلك ما يصل إلى ١% من الإنتاج السنوى للمنتج، لأنه لا يوجد عادة أكثر من ١٠٠ إلى ١٥٠ عبوة فى السنة، وعلى الرغم من تلوث العديد من التخمرات، إلا أن القليل منها هو الذى يتلف تماما .

ويمكن أن تنتج الفيروسات البكتيرية المسماة بالفيروسات الملتهممة phages نوعاً ثانياً من التلوث، وعادة ما تظهر عدوى الفيروسات الملتهممة فى صورة انحلال سريع للكتلة الكلية للخلايا المنتجة. وقد تام للتخمر، والبكتيريا

لمستخدمة فى إنتاج الأحماض العضوية والأمينية تعتبر عرضة على وجه
لخصوص لهذا النوع من التلوث، ويجب حمايتها عن طريق تشغيل التخمير فى
ضل ظروف تعقيم صارمة، وبمجرد أن يحدث التلوث، تظل المعدات المستخدمة
تحت خطر متزايد من مشاكل أخرى، ويجب أن يحدد مصدر الملوث بسرعة،
وأن تعقم جميع المناطق المصابة للحماية من مصادر التلوث المتكررة.

وتشكل الطفرات التى قد تظهر بصورة تلقائية فى الكتل الميكروبية نوع ثالث
من الملوثات، وكلما ازداد عدد الأجيال خلال دورة واحدة، زاد احتمال ظهور
طائفة فرعية قليلة الإنتاجية، وهذا يعتبر أحد الأسباب الرئيسة الذى يفسر عدم
اتباع عمليات التخمير المستمر للعديد من المنتجات، وكلما جرى تعديل الكائن
العضوى وانتخابه لتكوين منتج عال، يكون العبء الاختيارى أكبر للطائفة
الفرعية غير المنتجة من الكائن الدقيق، لأنها ستكون لها الغلبة على العبوة.

وهناك معوق ثان للإنتاج، وهو الحاجة إلى توفير وسائل نقل الأكسجين بقدر
كاف للتخميرات الهوائية aerobic fermentation، للحفاظ على معدلات نمو عند
كثافات خلية عالية، وعندما تبدأ الكتلة الميكروبية فى النمو، يجرى توفير المواد
الغذائية بمعدلات مرتفعة جداً بواسطة الطلمبات، بينما تكون وسائل إدخال
الأكسجين أقل كفاءة، ولكى تنمو الكتل الميكروبية بسرعة فى الأوعية ذات
السعة الأقل من ١٠٠٠ لتر، يكون القيد الرئيس لنمو الخلية هو الأكسجين، بيد أنه
عندما تزيد سعة وعاء التخمير عن ١٠٠٠ لتر، يصبح العامل الأكبر المقيد هو
التخلص من الحرارة، لأن زيادة وعاء التخمير يعنى وجود مساحة سطحية أقل
لكل وحدة حجم من الانبعاث الحرارى، وفى هذه الحالة، يكون نقل الأكسجين

كاف، بينما لا يكون التخلص من الحرارة كاف للاحتفاظ بدرجة حرارة تخمر مناسبة.

وتشكل لزوجة حساء التخمر معوق إنتاج ثالث محتمل، فبعض الكائنات الفطرية تشكل شبكة من الخيوط تسمى بالفطر الغصيني mycelia ، وعلى الرغم من أن هذه الكائنات، ولو أنها بطيئة النمو، لا تكون مقيدة بتوفر الأكسجين، فإن لزوجة الحساء قد تصبح عالية بدرجة كافية كلما ازدادت كتلة الخلية، بحيث يصبح من الصعب ضخ الحساء، وعند هذه النقطة يجب إيقاف التخمر، لأن الحساء يجب أن ينقل بالمضخات لخطوات تشغيل تالية.

والمعوق الرابع، هو الحاجة إلى التخلص من عناصر غير المستخدمة فى حساء التخمر، وتكون كتلة الخلية نفسها عادة أكبر العناصر غير المرغوبة، وقبل أن يتم تحديد التلوث البيئي بأنه مشكلة كبرى، كان يلقي بكتلة الخلية فى مقلب النفايات، لكنه بمجرد أن منعت الوكالات التنظيمية هذا الإجراء، كان يتم معالجة المخلفات بدلاً عن ذلك فى وسائل معالجة فى المواقع التى توفرها البلديات، وشجع هذا الإنفاق على تطوير مادة المخلفات الصلبة كإضافة عالية البروتين لغذاء الحيوان، وقد تحسنت هذه الأيام معظم الكائنات التجارية المستخدمة بصورة تجارية لاستخدامها كإضافات غذائية، ويستثنى من ذلك البكتيريا إيريشريا كولاي Escherichia coli، التى تعتبر أحد الأنواع البكتيرية الرئيسة المستخدمة لصنع البروتينات الغريبة، والبكتيريا الأخرى التى تحتوى على سموم، وبدلاً من الحصول على ميزة ٥% إلى ١٠% لكل رطل من بيع الكتلة الخلوية المتبقية من هذه الكائنات، فإن القائم على التصنيع يضطر إلى دفع من ١٠ إلى ٢٠ سنتاً عن كل رطل للتخلص من المادة فى المقابل العمومية.

تأثير تكنولوجيا الد . ن . أ . المطعم

The impact of recombinant of DNA technology

اعتقد الاستخدام المبكر للكائنات المجهرية فى التخمرات على اختيار سلالات معينة موجودة بصورة طبيعية ، تنتج المنتجات النهائية المرغوبة ، واشتملت هذه السلالات على الخمائر المنتجة للكحول ، والفطريات الموجودة بصورة طبيعية التى أنتجت الأحماض العضوية ، وعلى الرغم من أن مسارات الأيض الأساسية لهذه الكائنات العضوية متماثلة فى جوهرها ، إلا أنه طورت أنواع عديدة بحيث يمكنها أن تنمو فى ظل ظروف بيئية مختلفة من تركيز الأكسجين ، والأس الهيدروجينى ، ودرجة الحرارة ، فالأحماض العضوية على سبيل المثال ، تقلل من الأس الهيدروجينى للبيئة المحيطة للمستوى الذى تفضله الكائنات الدقيقة، وتبيد المضادات الحيوية البكتيريا الغريبة التى قد تكون منافسة، ويتيح إنتاج مذيبات ثانوية مثل الإيثانول أن تحافظ الكائنات الدقيقة على التوازن السليم بين الأشكال المختزلة والمؤكسدة للجزيئات التى تساهم فى أبيض الطاقة ، وتوفر أيضا القدرة على استخدام ركائز مختلفة كمصادر طاقة المميزات التنافسية للميكروبات .

ولما تطورت الكائنات المجهرية لكى تبقى وتتكاثر بسرعة فى بيئات معينة ، فقد أصبحت فعالة جداً ، وتنتج القليل من المخلفات ، وهذا يعنى من بين أشياء أخرى ، أن الخلايا تظل مسيطرة بصورة دقيقة على المسارات البيوكيميائية العديدة التى تقوم بها ، وأنها لهذا السبب تعتبر ضرورية لإفساد الضوابط الداخلية من أجل زيادة غلة المنتج ، وغالباً ما ينشأ الضبط من خلال إيقاف تعبير الجينات التى تشفر عن المنتجات نفسها ، أو عن الإنزيمات المطلوبة لصنع أو هدم المنتجات ، ويمكن أن تولد الخلية مستوى أدق من التنظيم عن طريق إيقاف نشاط الإنزيمات بعد أن تصنعها .

وإحدى طرق تمزيق هذه الضوابط الداخلية ، استخدام عدة عوامل طافرة ، مثل المواد الكيميائية أو الإشعاع ، التي تغير د . ن . أ الخلية عند مواقع عشوائية ، وفي غالب الأحوال ، تكون الطفرات المتكونة مشلولة وعديمة الفائدة ، بيد أنه من خلال إطفار وفصل قدر كبير ، يمكن أن توجد الطفرات وبها الد . ن . أ ممزق في مواقع معينة تجعل الخلية تفقد سيطرتها ، إما على تخليق إنزيم مهم في المسار الذي يصنع منتجاً مرغوباً ، أو على نشاط الإنزيم ، ونتيجة لذلك ، تنتج الخلية تركيزات متزايدة من المنتج وتفرزه في البيئة المحيطة ، وعملية الطفر المتبوعة بالاختيار كانت ولا تزال إجراء مجهدا وغير دقيق للحصول على كائن دقيق معين غير منتظم .

وتوفر تكنولوجيا الد . ن . أ المطعم طريقة مباشرة لاستغلال أيض الخلية لإنتاج منتجات بيوكيميائية معينة ، وقد برهنت التكنولوجيا على فائدتها العظيمة في تحديد التسلسلات النكليوتيدية للد . ن . أ داخل وحول الجينات ، والتعرف على تلك القطاعات المطلوبة من أجل التحكم في الجينات أو منتجاتها ، وتشكل هذه القطاعات الأهداف الرئيسية التي يمكن أن تطفر على وجه التحديد أو تلغى أو تغير التحكم في الجينات ، ويمكن أيضا إدخال جينات جديدة في الخلايا البكتيرية لإعطائها قدرات تخليق جديدة .

والتأثير الأول لتكنولوجيا الد . ن . أ المطعم على الإنتاج الميكروبي للمواد الكيميائية الصناعية سيكون في الغالب تحسين للإنتاجية ، وتتكون معظم المصادر الكربونية حاليًا من النشويات التي يجب أن تتّميا إلى سكريات بسيطة قبل أن يمكن أن يستخدمها الكائن المجهرى ، ولا تتم عملية التميؤ بالكامل لكنها تترك من ١% إلى ٢% من النشا كدكستريانات حدية limit dextrins ، التي تعتبر سكريات عدادية قصيرة السلسلة تحتوى على نقاط تفرع الجزئ الأصيل ،

وتحتوى النشويات المتميأة أيضا على سلولوز غير متمياً يصل إلى حوالى ١٠% من الكربوهيدرات الكلية .

وإذا أمكن إدخال جينات جديدة تشفر عن إنزيمات لهضم الدكسترينات الحدية والسلولوز إلى كائنات مجهرية صناعية ، فقد يزداد الانتفاع بمصادرها الكربونية بنسبة ٢% إلى ١٠% ، وقد توضح مثل هذه الاستراتيجيات الحاجة إلى الحملة الإنزيمية والكيميائية المطلوبة حالياً من أجل تحويل سكريات عديدة polysaccharides مثل النشا إلى سكريات ، وقد يسمح إدخال جينات أخرى فى الميكروبات لأن تستبدل مصادر كربونية مثل اللاكتوز من ماء الجبن أو سكريات البنروز Pentose sugars من الورق وصناعة اللب بالنشا المتمينة، ومن خلال إضافة قدرات جينية جديدة للكائنات الدقيقة التجارية ، فقد تصبح المواد الخام الإضافية منخفضة التكلفة متاحة من أجل التصنيع الكيميائى .

وأحد الأهداف الرئيسة لتطوير عملية التخمر هو زيادة غلات المنتج مع انخفاض تعقيد وتكاليف المواد الخام ، وبعد استخدام القدر الأكبر من المادة الخام للإنتاج المباشر للمنتج النهائى بأقل ما يمكن من تراكم للمنتج الثانوى من الأمور المطلوبة للغاية ، ويكون الأسلوب الأفضل لتقليل هذا التراكم عن طريق فصل النمو عن تكوين المنتج ، بحيث يمكن استخدام الكتلة الحيوية لعدد أكبر من المرات من أجل الغرض الوحيد لتحويل المواد الخام إلى منتج نهائى ، وقد حدث هذا مع إنتاج الحمض الأمينى من خلال تعديل الكائن الدقيق جينياً لزيادة تركيزات وأنشطة الإنزيمات الضمخوية intracellular enzymes التى تخلق المنتج .

وبالنسبة لصور التخليق التى تتطلب تفاعلات مزدوجة الطاقة ، فقد يكون مستوى أدنى من نمو الخلية ضروريًا للحفاظ على توازن الاختزال - الأكسدة فى الخلية ، وتتضح مصداقية استراتيجية فصل النمو عن تكوين المنتج بشكل جلى بأمثلة مثل تخمر الخلون - بيوتانول الموضحة سابقا ، التى يقترب فيه الحد النظرى لغلة المنتج من الحمض العضوى الوسيط .

وبعد ثانى أكسيد الكربون ثانى منتج ثانوى كبير فى التخمرات ، وتضع الرياضيات الكيميائية stoichiometry للتفاعلات داخل الخلية حدًا على مقدار الكربون المتحول إلى ثانى أكسيد كربون ، ويمكن إنقاص هذا القدر فى بعض الحالات عن طريق إعادة توجيه انسياب الكربون داخل الخلية ، ويمكن إجراء ذلك من خلال إضافة جينات جديدة للمسارات البديلة التى تسمح باستخدام مواد خام مختلفة ، ويكون ذلك مجديًا بصفة خاصة إذا كان مصدر الكربون البديل يلزم فى مسار التخليق عند موقع أقرب للمنتج النهائى عن موقع الدخول بالنسبة للمادة الخام الأصلية ، وقد تكون النتيجة تحسنا ملموسا فى الحصيللة الإنتاجية من المواد الكيميائية الصناعية التقليدية ، وتتيح أساليب الهندسة الوراثية الحديثة أيضًا لعمليات الإنتاج العالى لمنتجات جديدة بأن تنمو فى فترة أقل من الوقت الذى تتطلبه الأساليب التقليدية للطفر والاختيار .

وبعد تقليل مدة دورة التخمر مدخلًا آخر لتحسين التخليق الحيوى للمواد الكيميائية الصناعية ، وغالبًا ما تنمو الكائنات الدقيقة المستخدمة فى التخمرات بصورة بطيئة ولا تجمع كميات كبيرة من المنتجات النهائية إلا بعد أن تصل الخلية إلى كثافة عالية ، ويكون الزمن الكلى للعملية فى صورته النموذجية فى حدود يومين إلى أربعة أيام ، يكون خلالها التخمر مهددًا بالتلوث بالبكتيريا

الملتهمة أو الغريبة أو الطافرة، وعلى ذلك، فأى إنقاص لدورة التخمير يعطى ميزتان: إنتاجية عالية، وكنتيجة لذلك، تكاليف رأسمالية أقل لكل وحدة منتج، وتقليل لعدد عبوات التخمير التالفة بسبب التلوث.

وقد يمكن زيادة معدلات النمو باستخدام كائن مجهري سريع النمو مثل، إيريشيا كولاي، وأن تصمم بداخله القدرة على إنتاج المنتج المطلوب، أو، كما ذكرنا من قبل، يمكن فصل مرحلة النمو عن مرحلة الإنتاج، وبمجرد الوصول إلى كثافة الخلية الصحيحة، يمكن أن يتحول الكائن الدقيق من مرحلة النمو إلى إنتاج المنتج السريع عن طريق تنشيط إنزيم رئيس خلال مسار التخليق ومن خلال نمو الكائن الدقيق دون إعاقة، فإنه سيكون فى وضع تنافسى أفضل مع البكتيريا الغريبة والطافرات، ونتيجة لذلك يقل عدد العبوات التالفة بسبب التلوث، وعندما يكون المنتج النهائى ساماً لنمو الخلية، فيكون لهذه الإستراتيجية فائدة إضافية عن طريق السماح للخلايا بأن تصل إلى كثافات عالية قبل تراكم تركيزات المنتج الضارة.

وتولد الحرارة، تعتبر المعوق الرئيس لعمليات التخمير للكميات الكبيرة، ولما كان يجرى تشغيل معظم عمليات التخمير التجارية بالقرب من درجات الحرارة الكامنة، فيلزم للتخلص من الحرارة استخدام المياه المبردة لتبريد أجهزة التخمير والأسطح الكبيرة الناقلة للحرارة، ويمكن لدرجات الحرارة أن ترتفع، ويمكن التخلص من مشكلة الحرارة بدرجة كبيرة، إذا أمكن تطوير سلالات من الكائنات المجهرية المنتجة، التى تتحمل درجات حرارة عالية، وقد يسمح ذلك لدرجة حرارة التخمير بأن ترتفع من ٣٥ درجة مئوية إلى ١٠٠ درجة مئوية تقريباً، وتستطيع الكائنات الدقيقة المحبة للحرارة أن تنمو فى درجات حرارة عالية كهذه.

وتعد هندسة البروتين protein engineering قوة دافعة رئيسة أخرى للبحث فى الاستغلال الجينى ، ويمكن استخدام أدوات أساليب تكنولوجيا الـ د . ن . أ . المطعم لتغيير التسلسل النكليوتيدى nucleotide sequence لـ أى جين ، وبذلك يجرى تغيير البروتين المناظر ، ويستخدم هذا الأسلوب حالياً فى تغيير أنشطة البروتينات العلاجية الجديدة ، لكنه ذات إمكانات عظيمة أيضاً للبروتينات الصناعية الأخرى ، ومن السلع المفيدة للعالم الصناعى ، ألياف الأنسجة والمواد اللاصقة ، والحرير الذى يعتبر كله بروتيناً أحد ألياف الأنسجة القوية التى يعرفها البشر ، وقد يكون من الممكن استخدام الهندسة الوراثية فى تغيير تركيب الحرير من أجل تحسين خصائصه المفيدة فعلاً ، وبإدماج جينات لإنتاج الحرير فى كائنات بديلة ، قد يؤدى إلى إنتاجه بتكلفة رخيصة .

وتعتبر المادة اللاصقة ذات الأساس البروتينى ، التى تستخرج من حيوانات قشرية بحرية ، من أقوى المواد اللاصقة المعروفة ، وقد يسمح التعديل الوراثى لـ حين البروتين اللاصق باستخدام المادة فى مجالات تتدرج من الجراحة وحتى التصنيع ، ويسمح عزل الجينات ووضعه فى كائنات مجهرية مناسبة بالإنتاج التجارى من البروتين بكميات كبيرة .

والخلاصة ، فقد فتحت أدوات تكنولوجيا الـ د . ن . أ . المطعم الحديثه حالياً ، إمكانات هائلة لاستغلال المصانع الكيميائية المصغرة القائمة على الكائنات الدقيقة ، وكانت المنتجات الأولى من التكنولوجيا الجديدة ، بروتينات علاجية therapeutic proteins مثل الأنسولين البشرى وهرمون النمو فى مجال الرعاية الصحية ، وسوف يتبعها تطورات فى الإنتاج الميكروبى للأحماض الأمينية والأحماض العضوية الصناعية ، كما ستسمح التحسينات الأخرى باستخدام مواد خام جديدة وتقليل تكاليف الإنتاج .

وبمجرد أن ترتفع أسعار البترول مرة أخرى، فسوف يتبعها بنشاط متواصل تطبيق تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم لإنتاج مواد كيميائية صناعية كالمدونة بجدول ١-٣، وسيكون المجال التالي ذا التأثير الكبير في تعديل البروتينات والسكريات العذائية، لخلق منتجات جديدة من أجل الاستخدامات الصناعية، وسيضمن القدر الكبير من الجهد العلمى المبذول حالياً على المستوى الدولى بصورة فعلية تحقيق هذه التطورات خلال السنوات الباقية من هذا القرن.

..

الفصل الرابع:

استنساخ الجين يفتح جبهة جديدة فى مجال الصحة

Gene cloning opens up a new frontier in health

جاءت التطورات الحديثة فى البيولوجيا الجزيئية molecular biology بمجموعة مناهج بحثية قوية وجديدة لاستخدامها فى الأبحاث المتعلقة بالأسرار الجزيئية للحياة، وهذه الأدوات التى قدمت معظمها تكنولوجيات الـ د.ن.أ. المطعم والأجسام المضادة أحادية الاستنساخ، تعجل من إحراز معرفة كيميائية حيوية للفسيولوجيا البشرية، ومما له دلالة خاصة، هو أن تأثير هذه الأساليب التى ساهمت إلى حد بعيد فى إحداث ثورة فى التكنولوجيا الحيوية، يتركز على البحث عن أسباب الأمراض البشرية، فلم تكف هذه الأساليب فقط بكشف غموض الآليات المعقدة الكامنة وراء الأمراض البشرية، لكنها تفتح أيضاً فى الوقت ذاته جبهات جديدة لتشخيص وعلاج تلك الحالات.

البروتينات والجينات فى البحث العلمى المتعلق بالصحة

Proteins and genes in health research

البروتينات البشرية

Human proteins

كشف الفهم المتعمق للأسس البيوكيميائية للحياة عن الأهمية الكبيرة للدور الذى تلعبه البروتينات فى الفسيولوجيا "علم وظائف الأعضاء" physiology (شكل ٤-١). والبروتينات، التى تشكل طائفة الجزيئات الأكثر وفرة فى الكائنات الحية، تؤلف العناصر الإنشائية الرئيسة للخلايا البشرية، وتشمل البروتينات الإنشائية مادة الكولاجين collagen الموجودة بالبشرة والنسيج

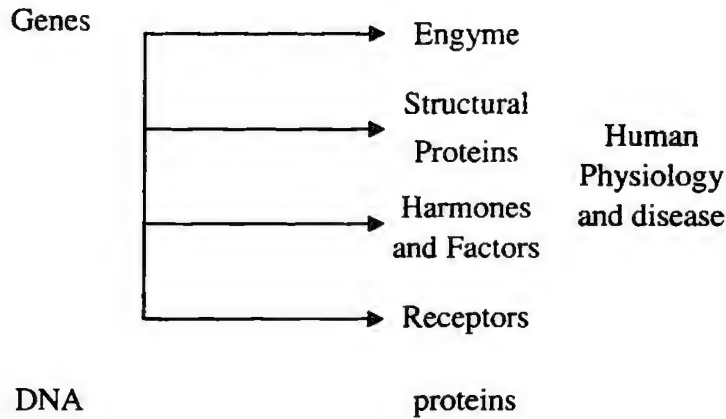
الضام connective tissue، ومادة الكارتين keratin الموجودة بالشعر، والميوسين myosin (الجلوبين العضلى) وأكتين actin (البروتين العضلى) العضلة . وتلعب البروتينات أيضا أدوارا منظمة رئيسة، فالإنزيمات التى تحفز جميع التفاعلات البيوكيميائية فى الخلايا الحية، هى بروتينات، بالإضافة إلى ذلك، فإن العديد من الجزيئات التى تنقل إشارات منظمة من إحدى الخلايا والأنسجة أو الأعضاء إلى أجزاء أخرى، هى بروتينات ، وقد كانت هرمونات بروتينية مثل الأنسولين، والجلوكاجون glucagon (عامل رافع لسكر الدم)، وهرمون النمو، معروفة منذ عقود عديدة .

وتشمل البروتينات المكتشفة مؤخرا ، التى تعتبر مهمة فى الاتصالات ضمنخلوية السيتوكينات cytokines (هرمونات انقسام خلوية) العديدة - الانترليوكينات interleukins، على سبيل المثال - التى تستخدمها خلايا الجهاز المناعى للاتصال ببعضها ، وعوامل الإطلاق releasing factors التى تنظم إطلاق هرمونات عدة غدد نخامية pituitary hormones، ومجموعة العوامل التى حفز على نمو الخلية، وقد تم عزو العديد من الأنشطة الإضافية الأخرى حتى الآن إلى عوامل بروتينية غير معزولة وغير مميزة .

والجزيئات العضوية غير البروتينية Non-protein organic molecules التى تشمل السواد الأعظم من الهرمونات والمواد الكيميائية التى تنقل الإشارات فى الجهاز العصبى، تنقل أيضاً إشارات ضمنخلوية، بيد أن جميع جزيئات التنظيم الحيوى ، سواء كانت طبيعتها بروتينية أو غير بروتينية ، يجب أن تتفاعل مع جزيئات معينة يطلق عليها المستقبلات receptors، على أسطح الخلايا الترسية target cells لكى تحدث تأثيراتها، ولما كانت المستقبلات هى نفسها

بروتينات ، فإن كل تفاعل منظم بين خلية و خلية يتضمن بروتينات معينة ، إما أن تقوم بدور الإشارة أو المستقبل أو كلاهما .

وقدمت التكنولوجيا الحيوية مجموعة أساليب قوية لتحليل البروتينات ومن أجل إنتاجها واستغلالها، ونظرًا للدور المحوري الذي تلعبه البروتينات في جميع أنشطة الخلايا الحية، فإن التأثير القوي لدى التكنولوجيا الحيوية في إنتاج عقاقير علاجية جديدة، واختبارات تشخيصية قد تم فهمه بسهولة.



شكل ٤-١ . العلاقة بين الجينات والفسيولوجيا البشرية

استنساخ الجين ، والتقدم فى الكيمياء الحيوية للبروتين

Gene cloning and the progress in protein biochemistry

كل بروتين بغض النظر سواء كان إنزيمًا أم مستقبلًا أو هرمونًا أو بروتينًا إنشائيًا ، هو تمثيل مباشر لجين معين ، فالآلية المخلقة للبروتين التى توجد فى جميع الخلايا ، يمكنها أن تحول التسلسل الجينى إلى تسلسل البروتين المناظر وفقا لقواعد الشفرة الجينية genetic code ، وهذه الشفرة تساوى كودون يتكون من ثلاث نكليوتيدات متتالية فى د . ن أ الجين بأحد الأحماض الأمينية amino acids فى البروتين ، بحيث يعبر عن تسلسل طولى من نكليوتيدات ثلاثية فى د . ن أ فى صورة تسلسل طولى معين من الأحماض الأمينية .

قبل حقبة السبعينات ، كانت دراسات الكيمياء الحيوية للبروتين قاصرة تمامًا على إنزيمات وفيرة نوعًا ما ، وعلى بروتينات إنشائية ، وعلى بضعة هرمونات ، وكانت طرق عزل البروتين ووسائل التشخيص المتوفرة فى ذلك الحين طرقًا بدائية بمقاييس اليوم ، ونتيجة لذلك ، فإن العديد من البروتينات المنظمة الحيوية المهمة ، التى كانت تنتج عادة بكميات صغيرة جدا ، إما أنها لم تكتشف ، أو أنها لم تكن تخضع للدراسة ، ولم تكن المعرفة الكاملة بهذا التنوع ولأهمية هذه البروتينات النادرة متاحة .

وقد غير كل ذلك ، اكتشاف تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم recombinant DNA والقدرة على استنساخ الجينات ، وكما هو متوقع مع ظهور أى تكنولوجيا جديدة ، فإن توفر أساليب الـ د.ن.أ المطعم ، قد حث على تطوير طرق أخرى ، مهدت السبيل لإنجاز الإمكانات الكاملة للتكنولوجيا الأساسية ، وتشمل الطرق

لجديدة التى ظهرت مع تكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم، أساليب عزل وتحليل كميات صغيرة جداً من البروتينات.

وتتيح طرق القياس الدقيقة هذه حالياً، اكتشاف وتنقية وتحديد تسلسلات الحمض الأميني للبروتين الموجودة فى الأنسجة بكميات ضئيلة، وعلى الرغم من أنه منذ حوالى عشرة إلى خمسة عشر عاماً، كان إجراء هذه التحليلات يحتاج بضع مليجرامات من بروتين ، فأصبحت هذه التحليلات تجرى اليوم على مقادير تتراوح ما بين ١/١٠٠٠٠ إلى ١/١٠٠٠٠٠٠ من المقادير السابقة.

وبمجرد أن تتقى كميات صغيرة جداً من بروتين وتشخص بيولوجيا ويتحدد تسلسلها جزئياً، فإن البحث ينتقل إلى استنساخ الجين، ويتيح التسلسل الجزئى للحمض الأميني إنشاء مجس ، يمكن استخدامه فى التعرف على الجين الذى يشفر عن البروتين المطلوب، وعندما يستنسخ الجين، يمكن تحديد تسلسله الكامل، ومنه يمكن الحصول على التسلسل الكامل للحمض الأميني. ويمكن أن يستخدم الجين المستنسخ أيضاً كمجس للتعرف على أية جينات ذات صلة ومنتجاتها البروتينية.

بالإضافة إلى ذلك يمكن أن يستخدم الجين المكلون فى إنتاج كميات كبيرة من البروتين المناظر ، والذى سيكون فى جميع الأحوال تقريباً من الصعب الحصول عليها بطرق تنقية البروتين التقليدية . والجمع ما بين أساليب النسب الدقيقة للبروتين واستنساخ الجين وإنتاج البروتين من جينات مكلونة قد أزال بالفعل عزل البروتينات بكميات كبيرة من المصادر الطبيعية . ووضع الأساس

للاستخدامات الطبيعية . ووضع الأساس للاستخدامات الطبية للبروتينات النادرة سابقا .

كيف تستنسخ الجينات ؟

How genes are cloned ؟

استنساخ الجين Gene cloning هي تكنولوجيا تحديد وعزل ونسخ جين لبروتين معين ، بغرض إتاحة الجين للتحليل ، أو استخدامه في إنتاج البروتين ، وبصفة عامة ، يتطلب الاستنساخ مراحل ثلاث : اختيار البروتين أو النشاط البروتيني الذي يرغب من أجله الجين ، والتعرف على مصدر مادة وراثية تحتوي على الجين المطلوب ، وابتكار اختبار للجين أو منتجه ، يمكن أن يستخدم في الكشف عن استنساخ الجين المرغوب .

وعندما يوجد بروتين في خلية أو نسيج أو كائن عضوي ، فمن المؤكد أن يكون الجين المشفر عن ذلك البروتين موجود في د.ن.أ الخلوي - وفي الغالبية العظمى من الجينات في د.ن.أ كل خلية من خلايا الكائن العضوي ، ولتسهيل التعرف على جينات معينة ، غالبًا ما يستخدم الباحثون حينئذ « المكتبات » الجينية Gene library ، التي تعتبر بنوكا للجينات المستنسخة ، والتي تستخدم كمستودعات يمكن منها الحصول على الجينات ، بطريقة مشابهة للحصول على الكتب من المكتبات العامة .

وقد أعدت المكتبات الجينية من مصادر ميكروبية وحيوانية ونباتية عديدة ، وعلى سبيل المثال، فقد أعد توم مانياتس Tome Maniatis من جامعة هارفارد

بولاية ماساشوسيتس الأمريكية مكتبة واسعة الاستخدام من الجينات البشرية المستنسخة ، تمثل المادة الجينية الكلية لفرد واحد .

ولإنشاء بنك استنساخ كامل من هذا النوع ، فإنه يجرى أولاً شطر كل المادة الوراثية من خلية أو كائن عضوى إلى قطع بواسطة إنزيم قطع وقصر معين restriction enzyme بعد ذلك ، يجرى إدخال القطع بصورة فردية فى جزيئات الـ د.ن.أ ذات النسخ الذاتى ، والتى تسمى بالمتجهات vectors ، وتكون إما بلازميدات plasmids أو د.ن.أ من مصادر فيروسية ، ويتضمن الإدخال فى المتجهات تكوين جزيئات الـ د.ن.أ المطعمة ، أى مجموعات د.ن.أ من مصادر مختلفة ، وتختار المتجهات التى يمكن مضاعفتها بشكل غير محدود من خلية عائل ، تكون عادة كائناً عضوياً ذا خلية واحدة ، مثل البكتيريا . كولاى ، أو خميرة ، أو حيوان مستزرع ، أو خلايا نباتية .

وتتمو حينئذ كل خلية من خلايا العائل host cells ، التى تأوى كل واحدة منها متجهاً يحتوى على قطعة د.ن.أ غريبة معينة ، بحيث تكون كل خلية مستعمرة مستقلة ، أى مستنسخ clone ، توفر كل مستعمرة مورداً غير محدود من قطع الـ د.ن.أ التى اكتسبتها من مستعمرة الخلية الأم ، ويتكون بنك الاستنساخ ، أو المكتبة من مجمع من كل خلايا العائل ، التى يؤوى كل منها متجهاً يحتوى على قطعة د.ن.أ غريبة معينة ، وفى مجموعها ، تحتوى خلايا العائل على معظم أو كل المعلومات الوراثية من المصدر الخلوى الأصيل للـ د.ن.أ الغريب .

ويحتوى نوع آخر من البنوك الجينية على نسخ د.ن.أ الجينات ، التى لا يعبر عنها بفاعلية إلا فى خلايا معينة ، هذه البنوك المعبرة عن نسيج معين ،

التي تصنع من نسخ جزيئات ر . ن . أ رسول في نوع من الخلية في جزيئات
الـ د . ن . أ ، تحتوي على مستنسخات جينية أقل من البنوك التي تشكل الـ
د.ن.أ الكلى لكائن معين ، ومع ذلك ، فلا تزال تدخل جزيئات الـ د.ن.أ
المنسوخة في منتجات تسمح بنسخ الجزيئات المطعمة في خلايا عائل مناسبة .
وقد أتاح استخدام تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم إنتاج كميات كبيرة من أى
جين لأى كائن عضوى فى أى بيئة خلية عائل تقريباً ، والتحدى القائم هو
العرف على الجين المرغوب ، الذى يشبه تماماً البحث عن إبرة فى كومة قش .
والتشبيه مناسب تماماً لأن الإبرة (الجين المرغوب) ، يجب أن تكون موجودة
فى القش (مكتبة المستنسخات) ، إذا اختيرت خلايا معينة كمصدر للمادة
الوراثية المستخدمة فى تكوين المكتبة .

وتحتوى مكتبة الاستنساخ البشرية ، التى تتكون من قطع
بحجم الجين من الـ د . ن . أ الكرموسومى البشرى فى خلايا أ . كولاى
على مليون أو أكثر من المستنسخات المختلفة ، ولولا وجود الجينات
البشرية فى البكتيريا ، فلا يمكن تمييز الخلايا عن بعضها
البعض ، ولسوء الحظ ، فإن مكتبة الاستنساخ لا يتوفر بها نظام ديوى
العشرى Dewey Decimal System (تصنيف الجينات) للبحث عن الجين
الصحيح .

التعرف على هوية مستنسخ الجين المرغوب

Identification of the desired gene clone

يمكن تقسيم الطرق الرئيسية للتعرف على جين بروتين معين من بنك استنساخ إلى ثلاث فئات، وتتوقف على ما إذا كان يستخدم اختبار الجين معلومات تسلسل البروتين، أو النشاط البيولوجي لمنتج الجين، أو أجسام مضادة معينة يمكن أن تكشف عن وجود المنتج الجيني (شكل ٤-٢).

• DNA probe assay

Based on partial
sequence of protein

Human gene
expression library

• Immunological assay

Based on antibody test
specific for protein

Gene clone
for desired
protein
(~1 of 1 000 000)

• Biological assay

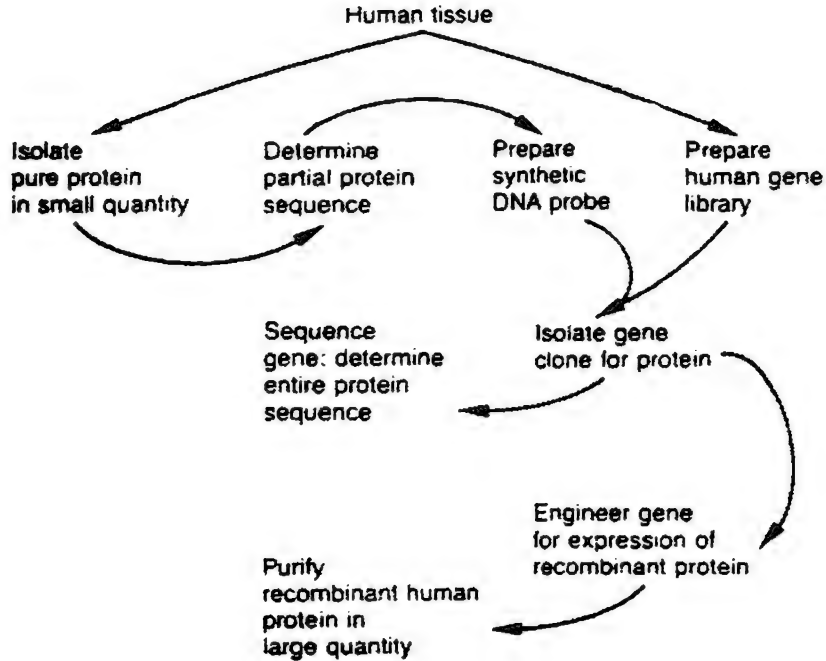
Based on intrinsic
activity of protein

شكل ٤-٢. طرق التعرف على جين معين في "المكتبة"، إن التعرف على الجين المرغوب يكون عادة الجزء الأكثر صعوبة في عملية الاستنساخ، تتكون المكتبة الجينية من عديد ربما يصل إلى المليون - من مستنسخات الخلايا المختلفة، تحتوي كل منها على قطعة د.ن.أ من مادة المصدر، وقد يكون الجين المطلوب موجود في مستنسخ واحد فقط أو عدة مستنسخات على الأكثر، وتشبه المشكلة في جوهرها البحث عن ليرة في كومة قش.

ويمكن التعرف على المستنسخ الصحيح بواسطة مجس الجين نفسه، ويتكون المجس من قطعة من الد.ن.أ مرقمة إشعاعياً، لها تسلسل منظر لتسلسل الحمض الأميني المعروف لقطعة البروتين، والطريقة بديلة، إذا صنع المنتج البروتيني للجين في الخلايا المستنسخة، فيمكن الكشف عنه بواسطة جسم مضاد معين، أو بعمل اختبار للنشاط البيولوجي الحقيقي للبروتين.

في الحالات التي يتوفر فيها تسلسل حمض أميني جزئي لمنتج الجين المطلوب، فإنه يمكن إنشاء مجسات د.ن.أ مرقمة إشعاعياً، تحتوي من ١٥ إلى ٢٠ نكليوتيداً، بحيث يكون لها تسلسلات نكليوتيدية تتأظر تسلسل الحمض الأميني (شكل ٤-٣)، وسوف يكون هناك عدة تسلسلات نكليوتيدية محتملة

متوقعة، لأن لمعظم الأحماض الأمينية أكثر من كودون واحد، وبناء عليه يجب أن تخلق عدة مجسات.



شكل ٣-٤ مخطط لاستمساخ جين بشري، تتطلب إحدى طرق الاستمساخ أن يتم عزل كمية صغيرة من البروتين التي يشير عنها الجين، وأن يحدد تسلسل الحمض الأميني الجزئي، من هذا التسلسل يمكن التنبؤ بالتسلسل النكليوتيدي لقطعة الـ د.ن.ا المناظرة للجين، بعد ذلك يجري تخليق قطعة الـ د.ن.ا بصورة إشعاعية وتستخدم كمجس للكشف عن المستمسخ البكتيري في مكتبة الجين البشري، التي تحتوي على الجين نفسه، بمجرد التعرف على المستمسخ الصحيح، يمكن الحصول على الجين بكميات مناسبة لتحديد تسلسله النكليوتيدي الكامل، وبذلك يمكن تحديد تسلسل الحمض الأميني الكامل للبروتين، ويمكن أيضاً وضع الجين في 'منتج تعبير' يسمح بصنع كميات كبيرة من البروتين في إحدى الخلايا السهلة النمو مثل بكتيريا خميرة.

ويرتبط المجس المرقم إشعاعياً بأى جين له تسلسل دن.أ.متمم، ويجب أن يشفر الجين المكتشف بهذه الصورة عن التسلسل البروتينى الذى تأسس عليه المجس، وفى ظروف تجريبية معينة، سيتعرف المجس المرتبط على الجين المرغوب من بين ملايين الجينات الموجودة فى بنك الاستساخ، وقد استخدم الأسلوب مرات كثيرة لاستساخ جينات بروتينات لا يتم عزلها إلا بكميات قليلة تكفى لتحديد تسلسل الحمض الأمينى الجزئى الأولى.

وعندما يكون لبروتين نشاطاً بيولوجياً يسهل الكشف عنه، فإنه يمكن التعرف على الجين المناظر فى بنك استساخ عن طريق الفرز للتعبير عن البروتين، ويتطلب هذا الأسلوب، أن تنتج قطعة الجين الغريب بروتينا وظيفيا، مثل إنزيم أو هرمون، فى الخلايا العائلة، ويجب أن تكون لأية خلية تصنع البروتين، مستساخ الجين المطلوب. وقد استخدم فصل التعبير لاستساخ الجين كثيراً، حيث كانت للطريقة ميزة واضحة لعدم احتياجها لتنقية البروتين أولاً.

وتعتمد الطريقة الثالثة أيضاً على قدرة الجين المرغوب على إنتاج بروتينه، فى حين يتم فى هذه الطريقة الكشف عن وجود البروتين بواسطة جسم مضاد معين، بدلاً عن اختبار نشاط بيولوجى، والجينات المشفرة عن بروتينات يتوفر لها أجساما مضادة ملائمة، مرشحة لهذه الطريقة من طرق التعرف.

تعيين الصفات المميزة للجين واستغلاله

Gene characterization and manipulation

يعد التسلسل السريع للـ د.ن.أ أسلوباً آخر من الأساليب الناجحة التي طورت مع تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، كانت لطرق التحديد السريع هذه للتسلسلات النكليوتيدية للـ د.ن.أ أهمية كبيرة في تمييز الجينات المستنسخة، فقد جعلت عملية تسلسل البروتينات نفسها المضنية إلى حد ما، عملية مهجورة الاستخدام تماماً ، لأنه يمكن تحديد التسلسل النكليوتيدى كله لجين ما حالياً في غضون أيام، ومن ثم يمكن استخدام تسلسل الجين للحصول على تسلسل الحمض الأمينى للبروتين المناظر.

وغالبا ما يرغب الباحثون في تغيير تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات، إما بغرض استنباط علاقة مفصلة للتركيب لتقوم بالعمل أو لتعديل الوظائف الفسيولوجية للبروتينات بطرق معينة، وبمجرد أن يتم تخليق البروتينات فمن الصعب تغييرها بصورة مباشرة ، في حين يمكن تغيير الجينات حالياً بأى طريقة مرغوبة ، وسوف يمثل التغير بأمانة في البروتين الذى ينتجه الجين، ويمكن أن يصنع هذا البروتين المتغير إلى ما لا نهاية وبكميات كبيرة في مستنسخات الخلية التى يوجد بها الجين المتغير.

هندسة الخلايا وراثياً لإنتاج البروتين

The genetic engineering of cells for protein production

إن إحدى السمات المميزة للشفرة الوراثية genetic code وتخليق البروتين، هي احتفاظها تقريباً بكل صور الحياة المختلفة على وجه الأرض، هذه المشاركة في استخدام الـ د.ن.أ كمادة للجينات وكشفرة متطابقة لاستقراء الجينات في صورة بروتينات، تتيح استخدام خلايا أى كائن لإنتاج بروتينات من جينات مطعمة، وفي واقع الأمر ، أصبح حالياً من الممارسات البسيطة نسبياً في الهندسة الوراثية إنتاج البروتينات البشرية في الخلايا البكتيرية أو النباتية أو الحيوانية أن يستزرع جينا مستنسخاً ملائماً في الخلايا.

وعلى سبيل المثال، فإن بروتين الإنترفيرون البشرى interferon، الذى يجرى اختباره ليكون مضاداً للسرطان وعاملاً مضاداً للفيروس، كان لا يمكن الحصول عليه من قبل إلا باستخراجه من الخلايا البشرية، ولم تكن الكميات الصغيرة المستخرجة منه بهذه الطريقة تسمح للإنترفيرون بأن يقيم إكلينيكيًا فى أعداد كبيرة من المرضى ، وعلاوة على ذلك، فلدى البشر العديد من جينات الإنترفيرون، والمادة المعزولة من الخلايا البشرية هي خليط معقد من الإنترفيرونات المختلفة تركيبياً، ذلك الموقف الذى أضاف عبئاً على جهود تقييم كفايته الإكلينيكية، وبقدوم استنساخ الجين، أصبح من الممكن إنتاج الإنترفيرون النقى في الخلايا البكتيرية بكميات كبيرة، من أى من الجينات البشرية المختلفة.

وعلى الرغم من أن الشفرة الوراثية والآلية التى تستخدمها الخلايا لصنع البروتينات شيئان عموميان، فإن الإشارات الحقيقية التى تحكم تعبير الجينات، تختلف من كائن عضوى لآخر، ونتيجة لذلك، فللحصول على تعبير مرتفع لجين

منقول ، فمن الضروري دائماً أن يتم ربط تسلسلات الجين المشفرة عن البروتين بالتسلسلات الحاكمة في الكائن العضوى الذى يجرى داخله صنع البروتين.

وقد فهمت بصورة جيدة إشارات تعبير الجين gene expressing وتخليق البروتين لـ أ.كولاي، ذلك البكتير المعروف الذى درس بإسهاب طوال عدة عقود ، ومما لا يثير الدهشة حينئذ أن يكون أ.كولاي من الكائنات العضوية الأكثر استخداماً فى إنتاج البروتينات المطعمة، ويجرى عادة إدخال الجينات الغريبة فى جزيء دن.أ حلقى صغير، يطلق عليه بلازميد، الذى تم هندسته ليحتوى على وظائف جينية تضمن وقايته فى الخلايا البكتيرية، ويتم إدخال الجين الغريب عن طريق شق البلازميد بواسطة إنزيم قيد وقطع، وبعد ذلك يستخدم إنزيم يعرف بإنزيم ليجاز لربط أطراف الجين بأطراف دن.أ البلازميد.

ويجرى هندسة التعبير عن طريق إدماج إشارات منظمة من خلية عائل فى البلازميد مع الجين (شكل ٤-٤)، وفى معظم الحالات، تستخدم الإشارات التى درست بعناية، التى إما أن تكون مشتقة من أ.كولاي أو من جينات الفيروسات التى تصيب البكتير للحصول على تعبير الجينات الغريبة.

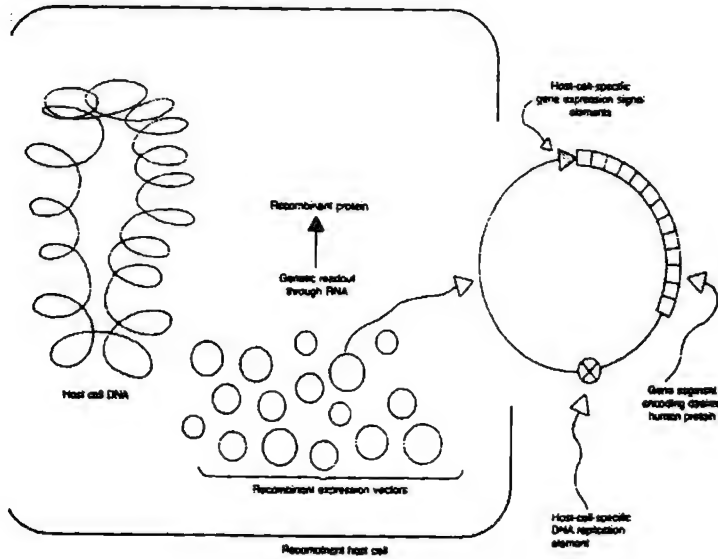
تعمل بعض البلازميدات المطعمة بصورة جيدة، للدرجة أنه عندما يجرى إدخالها فى أ.كولاي يصل عدد جيناته نحو ١٠٠٠ جين، فإن البروتين الغريب الذى ينتجه البلازميد يصل إلى حوالى ٦٠% من مجموع البروتين المصنوع داخل الخلايا البكتيرية، وباستخدام هذه التكنولوجيا القوية، يمكن الحصول على أى بروتين، بأية كمية تقريباً ، طالما كان من الممكن استنساخ جينه، والبروتينات البشرية التى تصنع بواسطة تخمر مستنسخات أ.كولاي مطعمة مناسبة، قد وفق

على استخدامها الاكلينيكي في البشر، وتشمل هذه المنتجات المطعمة، الأنسولين البشرى، الذى قام بصنعه Eli Lilly وزملاؤه في إنديانا بوليس بولاية إنديانا، وهرمون النمو البشرى الذى قامت بإنتاجه شركة جينتك Genentech Inc. فى جنوب سان فرانسيسكو بولاية كاليفورنيا، والإنترفيرونات البشرية التى قام بصنعها هوفمان لاروش Hoffmann La Roche, Inc. من نائلى بولاية نيوجرسي، ومؤسسة شيرينج بلف كورب. Schering-Plugh Corp. فى ماديسون بولاية نيوجرسي.

وخميرة الفطرية السكرية الجعوية *Saccharomyces cerevisiae*، هى فطر ذو خلية واحدة، له مميزات ممكنة معينة تتفوق على أ.كولاي فى إنتاج البروتينات البشرية، وتوجد بكتيريا أ.كولاي بصورة طبيعية فى أمعاء الإنسان، ويمكن أن تسبب مرضا فى ظروف معينة ، ونادراً ما تكون الخميرة كائناً يسبب المرض للبشر، وعلاوة على ذلك، فإنها تفرز بروتينات عديدة فى الوسط الذى تنمو فيه، الذى يعنى أنه يمكن جمع البروتينات دون الحاجة إلى فصلها عن البروتينات الخلوية للخميرة، وهناك ميزة أخرى لاستخدام خلايا الخميرة، هى قدرتها على إضافة سلاسل جانبية من السكر للبروتينات التى تصنعها، وتعتبر هذه السلاسل الجانبية ذات السمات الشائعة فى البروتينات البشرية والكائنات الراقية الأخرى، وقد تكون ضرورية للأداء السليم للبروتينات، ومع ذلك، فالسلاسل الجانبية المنتجة فى الخميرة، لا تشبه تماماً السلاسل الجانبية الموجودة فى خلايا الكائنات الثديية.

ويجرى إنتاج العديد من البروتينات البشرية المهمة فى الخميرة، بيد أن مميزات هذا الكائن المتفوقة على أ.كولاي فى إنتاج البروتينات الدوائية، لاتزال

فى حاجة إلى إثبات، ومع ذلك، فقد تكون الخميرة والخلايا الفطرية الأخرى مثالية فى إنتاج كميات كبيرة من البروتينات الكبيرة، مثل الإنزيمات الصناعية، التى تتأثر بها اقتصايات الإنتاج.



شكل 4-4 إنتاج البروتينات المصنوعة، يتم إدخال الجين المشفر عن البروتين المطلوب فى منتج تعبير (الذى يظهر مكبراً فى الجزء الأيمن من المخطط)، الذى يكون عادة إما بلازميداً أو فيروساً، ويتم إنتاج المنتج الجينى فى الخلايا المعلقة المرعوبة سواء كانت هذه الخلايا فى الأصل، بكتيرية، أو خميرة، أو خلايا ثديية أو نباتية، ويجب أن يحمل المنتج الإشارات الأساسية لنسخه فى الخلايا المعلقة، ويحمل أيضاً إشارات التحكم الجينى المطلوبة لنسخ د.ن.أ المنتج فى ر.ن.أ الرسول، والنقل اللاحق لـ ر.ن.أ الرسول داخل البروتين.

و غالباً ما يصعب تخليق البروتينات البشرية المهمة من الناحية البيولوجية فى أ.كولاي، التى لا تضيف سلاسل جانبية من السكر للبروتينات، وعلاوة على ذلك، فلعديد من البروتينات الثديية المهمة علاجياً تركيبات مطوية معقدة، والتى تعتبر ضرورية للنشاط البيولوجى للبروتينات وتدعمها وظائف متبادلة ذات طبيعة خاصة جداً.

وتشمل هذه البروتينات المعقدة منشط نسيج مولد البلازمين TPA، الذى قد يستفاد منه فى إذابة الجلطات الدموية، والمعامل VIII الذى يستخدم فى علاج مرضى الهيموفيليا، وبروتينات كهذه لا تصنع بالشكل الصحيح فى بكتيريا أ.كولاي، ولذا تصبح موادا خاملة، وقد طورت نظم الخلية التديية التى تصنع كميات كبيرة من البروتينات النشطة المطعمة، التى غالبا ما تفرز فى الوسط المزرى .

خطوات تقديمية فى فهم المرض

Advances in understanding disease

إن أعظم فائدة للتكنولوجيا الحيوية هى التعجيل الواضح الذى حدث فى اكتساب معرفة جيدة بالفسيولوجيا البشرية والمرض على المستوى الجزيئى (جدول ٤-١)، فبالإضافة إلى إبراز دور البروتينات العظمى، فإن الأبحاث تقدم معلومات جديدة عن الأوجه الوراثية للمرض، وبالتالى تؤدى إلى فهم أفضل للآليات الجزيئية التى تفسر سبب حدوث السرطان وأمراض معدية مثل الأيدز (مرض نقص المناعة المكتسبة)، ومهدت السبيل أيضا لطرق تشخيص، وربما معالجة الأمراض الوراثية.

جدول ٤-١ إسهامات التكنولوجيا الحيوية فى العلوم الأساسية

- تعجل الخطوات التقدمية فى أساليب التكنولوجيا الحيوية اكتساب المعرفة الأساسية المتعلقة بالنظم الحية عن طريق:
- ١- الكشف عن شبكات التحكم الفسيولوجية الطبيعية.
 - ٢- توضيح الأسباب الجزيئية للمرض.
 - ٣- الكشف عن العوامل والأحداث التنظيمية الأساسية .
 - ٤- تحديد الجزيئات المستهدفة والتفاعلات الجزيئية للتدخل العلاجى.

الاتصال بين الخلايا

Communication between cells

إحدى فئات البروتينات والببتيدات المهمة جداً، تلك الفئة المستخدمة فى الاتصال بين الخلايا، فالإشارة الضمنخلوية Intercellular signalling هى إشارات أساسية فى التنسيق الملائم لوظائف الأنسجة المختلفة وأعضاء الجسم، وغالباً ما يحدث هذا الاتصال بواسطة البروتينات المنظمة التى تفرزها إحدى الخلايا لتؤثر على نشاط الخلية الأخرى، وعلى الرغم من التعرف على المئات من هذه البروتينات المنظمة، إلا أن الباحثين قد بدأوا منذ فترة وجيزة فى التعرف على شبكة التفاعلات المعقدة التى تتحكم فيها .

ويعزى هذا التقدم إلى حد كبير إلى أساليب استنساخ الجين، حيث أمكن للمرة الأولى إنتاج بروتينات منظمة، مثل الهرمونات، وعوامل النمو، والمستقبلات بكميات كبيرة تكفى لتحليل أنشطتها، ولإستخدامها كعوامل علاجية عند الضرورة.

والإنترفيرونات من بين البروتينات الإشارية الضمنخلوية الأولى التى اختبرت بأساليب التكنولوجيا الحيوية، وعلى الرغم من أن التقدم كان يجرى

على تنقية اثنين من أنواع الإنترفيرونات الأساسية، إنترفيرونات ألفا وبيتا، من قبل أن تستسخ جيناتها، فقد أدت القدرة على استخدام الجينات المستسخة لصنع البروتينات البشرية في خلايا أ.كولاي إلى تعجيل هائل لأبحاث الإنترفيرون.

وعلى سبيل المثال، فقد أظهر الاستساخ وجود مجموعة تتكون من حوالي ٢٠ جيناً مختلفاً، تشفر عن إنترفيرون ألفا البشرى، ويجرى حالياً صنع بعض من هذه البروتينات، ويجرى تقييمها بيولوجياً وإكلينيكياً، فقد كانت الإنترفيرونات المطعمة التى صنعها هوفمان لا روش وشيرينج البروتينات المطعمة الأولى التى وافقت عليها هيئة الأغذية والدواء الأمريكية (FDA)، للاستخدام البشرى، والتى لم تكن تستبدل بروتيناً كان متوفراً بالفعل عن طريق التنقية من مصادر طبيعية. والدلالة المثيرة لتوفر الإنترفيرونات المطعمة، هى التقييم الإكلينيكى السريع والشامل لإمكانات البروتينات كعوامل مضادة للفيروس والسرطان، التى حدثت منذ اكتشاف الاستساخ، وعلى الرغم من أن فعالية الإنترفيرون كعامل وحيد لعلاج السرطان، كانت قاصرة إلى حد بعيد على الأورام الخبيثة النادرة نسبياً، فلم يكن للتقييم أن يتم إلا بتوفر البروتينات المطعمة، والآن وقد أصبح الإنترفيرون متوفراً حالياً لباحث الأورام الإكلينيكى، فإنه يمكن دراسة إمكاناته للاستخدام مع العوامل العلاجية الأخرى.

وكان للإنجاز النمطى للاستساخ، والتعبير، والتنقية لبروتينات التنظيم الحيوى النادرة بصورة طبيعية تأثيراً قوياً على دراسة بيولوجيا الخلية، وعادة ما كان يضطر إلى القيام بدراسات بيولوجيا الخلية السابقة بخلطات غير نقية من البروتينات النشطة حيوياً، وكانت الدراسات فى غاية الصعوبة وبصعب تكرارها.

وقد نتج عن التطورات التكنولوجية الحديثة اكتشاف العديد من البروتينات المنظمة الجديدة، وسهلت بعض التعقيدات التي كانت تحدث في الماضي من العمل بجزيئات بيولوجية غير متميزة ، وظهر التقدم جلياً في علم المناعة immunology، يعتمد الأداء الطبيعي لجهاز المناعة على مجموعة معقدة من التفاعلات بين خلية وخلية، التي تتخللها، إما بروتينات مفروزة، مثل اللمفوكينات lymphokines والسيتوكينات cytokines، أو بروتينات سطح الخلية، مثل مستقبل الخلية الغلافية T-cell receptor.

أحد هذه السيتوكينات cytokine هو إنترلوكين-٢، وهناك سيتوكيناً آخر هو إنترلوكين-١، وهو جزيء نشط تنتجه كريات وحيدة monocytes وأنواع أخرى من الخلايا المناعية، ويلعب دوراً حاسماً في تنشيط بعض الاستجابات المناعية، وقد ساور الشك الباحثون في الماضي في أن يكون للإنترلوكين-١ العديد من الأنشطة الإضافية، التي لا يقتصر جميعها على الجهاز المناعي، وتشمل هذه الأنشطة إحداث الحمى، وبعض الأنشطة التي يمكن أن تساعد على الشفاء الطبيعي للجروح، في حين يمكنها أن تساهم أيضاً في تطوير الالتهاب المزمن chronic inflammation، وبعض الحالات، مثل التهاب المفاصل arthritis.

ولما كان الباحثون غير قادرين على تنقية كميات معقولة من المواد التي تحدث التأثيرات العديدة، فلم يستطيعوا مقارنة تلك المواد بصورة مباشرة، والاستنساخ الحديث لجينين متباينين من الإنترلوكين-١ غير أنهما مرتبطان ببعضهما، قد حل المشكلة من خلال السماح بإنتاج البروتينات المطعمة النقية،

وقد أوضحت الدراسات التي أجريت على هذين البروتينين ،أن الإنترليوكينين-١
يعرضان سلسلة كبيرة من الأنشطة البيولوجية المختلفة.

وعلاوة على ذلك، فمقارنة إنترليوكين-١ المطعم بكاكيتين cachetin (مرض
متعلق باعتلال الصحة)،وهو منتج آخر وحيد الخلية ،الذى أصبح متوفراً فى
صورة مطعومة،كشف على أن أنشطة هذين البروتينين متداخلتان،بينما يظهران
اختلافات واضحة، وبالإضافة إلى ذلك، فبمقارنة تركيب الكاكيتين ونشاطه
بتركيب ونشاط عامل النقرس الورمي tumour necrosis factor ،الذى استنسخه
جينه أيضاً، أظهر أن هذين البروتينين متطابقان. ولما كان عامل النقرس
الورمي (TNF) وهو بروتين موجود بصورة طبيعية، قد بشر بآمال لاستخدامه
كعامل مضاد للورم ضد العديد من السرطانات،فقد بدأت التجارب الإكلينيكية
على ذلك العامل لمرضى الأورام قبل أن يثبت تطابقه مع الكاكيتين.

وقد أدى هذا الاكتشاف إلى تعميق فهم دور الجزيء بدرجة كبيرة فى
الфизиولوجيا البشرية،لكنه قلل من قيمته أيضاً كعامل مضاد للورم، وعلى الرغم
من أن الكاكيتين على ما يبدو،ينتج كجزء من جهود الجسم لمكافحة السرطان،إلا
أنه يسبب نقص تغذية شديد واعتلالا يسمى بالدفن cachexia الذى يظهر غالباً
على مرضى السرطان، وغالباً مايظهر عامل النقرس الورمي-الكاكيتين بأنه
الوسيط الرئيسى الموجود بصورة كامنة فى الصدمة التسممية الباطنية
القائلة،التي تحدث للمرضى بعد الإصابة ببعض الفيروسات الميكروبية
المرضية.

السرطان

Cancer

السرطان هو مركب من الأمراض لا تزال غير مفهومة بالكامل برغم جهود البحث التي استمرت لسنوات طويلة، فالخلايا السرطانية هي خلايا طبيعية تغيرت بطرق جعلتها تتكاثر بصورة غير صحيحة، فهي تظهر أنها تؤدي وظائف النمو والتميز الخلوية الطبيعية، لكنها تقوم بذلك في الوقت أو المكان غير المناسب أو بدرجة غير مناسبة، فقد تخلصت من سيطرة الجسم عليها، والبحث في الماضي عن أسباب المرض قد تدرج في عدة مسارات مختلفة، لدرجة أنه حتى وقت قريب، قد سار في تشعبات مختلفة ونادراً ما توصلت إلى شيء .

تهتم إحدى الطرق بتولد السرطان الكيميائي chemical carcinogenesis، وهي دراسة العوامل المولدة للسرطان التي تسبب الأورام في الحيوانات، وقد حددت هذه الطريقة أصناف المسرطنات الكيميائية، واقترحت أن العوامل تسبب السرطان عن طريق إحداث طفرات جينية، وعلاوة على ذلك، أوضحت الدراسات أن السرطان عملية متعددة الخطوات، تتضمن خطوات مستقلة، تبدأ بخطوة استهلاكية، والتي يحتمل أن تكون تغير جيني دائم، يستمر نحو خطوات نشطة تحول الخلية المتغيرة إلى حالة من الورم الخبيث malignant.

والفحص الدقيق عن المسار الطبيعي للسرطانات البشرية والأورام التجريبية التي استزرعت في الحيوانات قد أظهر بصورة مشابهة أن تطور السرطان هو عملية متعددة المراحل، وعادة ما تقتصر الأورام في المرحلة المبكرة على نسيج واحد، وفي الغالب فإن هذه الأورام تنتشر في المراحل التالية من المرض

فى أنسجة أخرى، ومع ذلك عظم تأت الدراسات التى أجريت على بيولوجيا
قورم بالكثير من المعلومات عن الآليات المتضمنة بدء السرطان وانتشاره.
وتقدم الأبحاث التى أجريت على التركيب الوراثى للسرطان دليلاً آخر على
صلة الجينات بتطور السرطان، فالعديد من الأشكال السرطانية، على الرغم منها
أنها عادة أنواع نادرة مثل، ورم ويلمز Wilm's tumour وورم جرثومة شبكية
العين retinoblastoma ، إلا أنها تحدث بشكل متكرر فى عائلات معينة وهى
حالة تقدم دلالة قوية عن الاستعداد الوراثى لهذه النوعية من الأمراض، وعلاوة
على ذلك، فهناك علاقة ارتباط قوية بين حدوث هذه الأمراض وسرطانات
أخرى وتشوهات كرموسومية معينة.

وكان البحث عن الفيروسات السرطانية أحد الموضوعات الرئيسة لأبحاث
السرطان طوال الخمسة عشر عاما الماضية، وأظهر هذا البحث أن بعض
الفيروسات تساهم بشكل مباشر أو غير مباشر فى تطور السرطانات البشرية،
وتشمل هذه الفيروسات على T-cell lymphotropic virus I البشرى، الذى يسبب
مرض سرطان الدم leukaemias والأورام اللمفية lymphomas وبعض سلالات
فيروس ورم الحلمة البشرى papilloma virus، الذى كان مرتبطاً بالسرطان
العنقى cervical cancer، وفيروس التهاب الكبد hepatitis B virus الذى يعتبر
المشارك البارز فى تطوير سرطان الكبد، وبصفة خاصة فى الصين ودول جنوب
شرق آسيا الأخرى، وفيروس Epstein-Barr، الذى يسبب ورماً لمفياً منتشراً فى
أفريقيا، وكان مرتبطاً أيضاً بسرطان أنفيلعومي nasopharyngeal cancer.

والأكثر من ذلك، فإن البحث الفيروسي، وخصوصاً على عدد من الفيروسات
التي وجد أنها تسبب السرطانات فى حيوانات التجارب، قد أسهم بدرجة كبيرة فى

تفهم التغيرات الكيميائية التي تحول الخلايا إلى حالة الورم الخبيث، وعزّت الدراسات إلى وجود جينات معينة تحملها فيروسات ورمية حيوانية، تسبب التحول إلى الخباثة الورمية malignancy، ترتبط هذه الجينات الورمية المسماة بمولدات الأورام oncogenes ارتباطاً مباشراً بالجينات الخلوية الطبيعية المسماة بمولدات الأورام البدائية proto-oncogenes، التي تقوم بدور النمو والتميز.

وعلى ما يبدو، فإنه أثناء دورة العدوى، تلتقط الفيروسات هذه الجينات الخلوية، التي أصبحت نتيجة لذلك نشطة بصورة غير ملائمة، وبالتالي تكشف عن إمكاناتها المولدة للسرطان، وقد توج البحث عن الفيروسات السرطانية بالملاحظة المهمة، وهي أن خلايا بعض السرطانات الموجودة بصورة طبيعية، والتي تشمل على الأورام البشرية، التي لا تصاحبها أية فيروسات معروفة، تحتوي على مولدات سرطانية نشطة ذات قدرة تحويلية.

وساعد اكتشاف المولدات السرطانية على التوفيق بين نتائج الطرق المختلفة عن أبحاث السرطان التي ذكرناها، فوجود مجموعة محدودة من الجينات، والتي توجد في جميع كرموسوماتنا، وقادرة على أن تؤدي إلى التحول المولد للسرطان عندما تنشط بصورة غير ملائمة، يعطى أساساً جزيئية منطقية لفهم السرطان.

تتضمن أحد خطوط البحث التي أشارت إلى أهمية نشاط مولد الورم oncogene في السرطانات البشرية، دراسات التشوهات الكروموسومية chromosomal abnormalities، التي توجد في العديد من الخلايا السرطانية، وعلى سبيل المثال، فورم بركت اللمفي Burkitt's lymphoma، وهو الورم الخبيث الذي ينمو بصورة هجومية في الخلايا الموجودة في الجهاز

المناعى تصاحبه ترتيبات كروموسومية معادة معينة، ينتقل فيها مولد السرطان الفطري myc oncogene الموجود بداخل الخلايا السرطانية إلى موقع كروموسومى جديد، ونتيجة لذلك، يبدو أن الجين يهرب من التنظيم الخلوى الطبيعى لتعبيره، ولذا يسبب التحول السرطانى للخلايا.

وقد أظهر وجود أورام سرطانية معينة بواسطة مولدات السرطان الكيمائية علاقة ارتباط قوية مع طفرات معينة، تقوم بتحويل مولد السرطانى البدائى إلى مولد سرطان، وقد وجدت نفس الطفرات فى خلايا بعض السرطانات البشرية، بالإضافة إلى ذلك، ظهر أن التحول الخبيث لبعض الخلايا المستزرعة يتضمن تنشيط مسرطين مستقلين ، ولذلك يعمل كنموذج لاختبار الانتشار المتعدد المراحل للسرطان فى البشر، فانتشار بعض الأورام السرطانية البشرية بصورة نمو انبثاقى وشديد الفتك ، كان يرتبط أيضاً بنشاط مولد السرطان.

ولم يتم التوصل حتى الآن إلى فهم كامل عن دور مولدات السرطان فى تطوير السرطان البشرى ، فهناك عوامل أخرى بالإضافة إلى نشاط مولد السرطان، قد تساهم فى إحداث المرض، وعلى سبيل المثال، توجد أدلة على أن فقد أو خمود نشاط المواد المعوقة لنمو الخلية، قد تكون أيضاً مشتملة فى مبحث أسباب السرطان، ومع ذلك، يساعد اكتشاف مولدات السرطان على تقديم القاعدة الأساسية فى اختبار الآليات الأساسية لتحول المولد السرطانى، وقد عجلت تكنولوجيا الـ د. ن. أ. المطعم والطرق المنهجية المتصلة بالموضوع بدرجة كبيرة هذه الأبحاث على الأقل، وربما تجعلها تتحقق على أرض الواقع.

أعراض نقص المناعة المكتسبة (الأيدز) Acquired immune deficiency syndrome

ربما تكون الحالة الأكثر وضوحاً لقوة وفائدة التكنولوجيا الحيوية في مجال الصحة، تلك المعركة الدائرة حالياً ضد أعراض نقص المناعة (الأيدز)، تلك الحالة التي اكتشفت لأول مرة في الولايات المتحدة في عام ١٩٨١، واتسمت بوجود عدوى غير عادية مبالغتها، أو صورة نادرة سابقة من سرطان يدعى بكابوزي ساركوما Kaposi's sarcoma أو كلاهما، وتم التعرف على المشكلة الأساسية بأنها هبوط شديد في الجهاز المناعي، ينشأ عن نقص كامل تقريباً لأحد أنواع الخلايا اللمفية T، وهي الخلايا المساعدة المطلوبة لبدء واستمرار العديد من الاستجابات المناعية.

وبحلول عام ١٩٨٣، كانت هناك دلالة كافية لوجود فيروس مكتشف حديثاً، يصيب ويفتك بالخلايا المساعدة ويسبب الأيدز، والطرق الرئيسة لنقل الفيروس تأتي عن طريق الاتصال الجنسي، ومنتجات الدم، والإبر الملوثة وقد ينتقل هذا الفيروس أيضاً من الأم لوليدها، إما في الرحم أو أثناء الولادة.

وتزايدت أعداد كل من المصابين بالأيدز والمصابين بالفيروس المعدي بصورة تضاعفية، ولولا التغيير في الزيادة التي نتجت عن التغيرات التي اعتبرت أساليب حياة الأفراد المصابين، لاستمر الوباء في الزيادة بكامل قوته، وبنهاية عام ١٩٨٦، كانت هناك أكثر من ٢٩٠٠٠ حالة إصابة بالإيدز، وسجل أكثر من ١٦٠٠٠ حالة وفاة في الولايات المتحدة وحدها، وكان هناك ما يزيد على مليون شخص يحملون فيروس المرض، ولا يزال عدد الأفراد الذين

سيطور معهم المرض في النهاية غير معروف، وتفيد الإحصائيات حالياً بأن ٣٠% من هؤلاء الأشخاص الحاملين للفيروس سيطورون المرض، بالإضافة إلى ذلك، ينتشر الإيدز في بعض مناطق وسط أفريقيا.

وتبذل حالياً جهود مضمنة من أجل فهم الإيدز والفيروس الذي يسببه، فقد تم في خلال عام واحد من اكتشاف الفيروس تحديد التسلسل النكليوتيدى الكامل لمجموعة العوامل الوراثية الفيروسية، وهو إنجاز آخر لتكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، ويجرى حالياً بذل الجهود لتشخيص وظيفة كل جين من جيناته، وفهم طبيعة عمل الفيروس، مما يعد عاملاً حاسماً في مقاومة تأثيراته في الأفراد الذين أصيبوا بالفعل، ولتطوير لقاحات لمنع مزيد من العدوى.

ولما كان الفيروس يشكل تهديداً كبيراً على أمان مورد الدم، فقد طورت الاختبارات بسرعة، وللتمكن من استبعاد الدم الذي يتبرع به الأشخاص الذين تعرضوا للمرض، وكانت الاختبارات الأولى غير متقنة، ولكن بعد سنوات ثلاث من تحديد الفيروس، تم تطوير اختبارات متقنة يعتمد عليها للكشف عن الفيروس، وتقييم مدى انتشار الإيدز في الأشخاص المصابين.

وهناك جهود تبذل حالياً لتطوير لقاحات للحماية من العدوى بفيروس الأيدز، وتصنع اللقاحات عادة من فيروسات ميتة وموهنة، غير أن فيروس الأيدز من الخطورة لدرجة أنه لا تتبع طريقة التحصين بالفيروس الميت تماماً، أحد المداخل للقاحات التي جرى استكشافها للحماية من الأيدز والأمراض الأخرى، هي التحصين ببروتينات الفيروس الممرض، ويمكن صنع البروتينات بكميات وفيرة بواسطة كائنات مجهرية مهندسة وراثياً، والتي يزود بها جينات فيروسية، وقد استخدمت هذه الطريقة كل من معامل أبحاث مرك شارب ودوم في راهواي

بولاية نيوجرسي ، ومعامل سميث كلاين والمعامل الفرنسية في فلادلفيا ، بولاية بنسلفانيا ، للوقاية من العدوى بفيروس التهاب الكبد الوبائي ب .

وتضمن مدخل آخر لصنع اللقاحات على التحصين بفيروس الجدري البقري *Vaccinia Virus* ، الذى تم هندسته وراثيًا لنقل وتعبير الموروثات المضادة من فيروس آخر ، فيروس الأيدز على سبيل المثال ، وفيروس الجدري البقري الذى استخدم بالفعل على نطاق واسع فى التحصين ضد الجدري *Smallpox* ، سوف يعمل فى هذه الحالة كوسيلة لإدخال الموروثات المضادة من فيروس آخر أكثر خطورة ، يستطيع إحداث استجابة مناعية وقائية .

وأخيرًا ، فقد تمكن أساليب الد . ن . أ المطعم الباحثين من إبطال مفعول فيروس الإيدز وراثيًا ، عن طريق إزالة أو تغيير جيناته ، بحيث يمكنه أن يصيب شخصًا ويولد مناعة وقائية ضد الصورة الفيروسية للفيروس دون أن يسبب المرض نفسه ومن السابق لأوانه إذا حدث ذلك ، معرفة أى من هذه المداخل التى ستجح مع فيروس الإيدز ، لكنه من الواضح أنه لا يوجد أحد منهم يتوقع نجاحه بدون الأساليب القوية للتكنولوجيا الحيوية .

ويعتبر إيجاد علاجات مؤثرة لمرضى الإيدز والمصابين بفيروس الإيدز ، الذين لم يقفوا تحت وطأة الإصابة الكاملة بالمرض تحديدًا آخر ، فأى عقار يمكن أن يبطل العدوى الفيروسية ، يمكن أن يمنع كل من انتشار المرض فى الأشخاص المصابين وفى غير المصابين .

وفى الماضى ، كان هناك نجاح محدود فى إيجاد العلاجات المؤثرة المضادة للفيروس ، ومع ذلك ، تقدم التكنولوجيا الجديدة الوسيلة للوصول إلى تحديد سريع للأنشطة المشفرة عن الفيروس الضرورية لنمو فيروس الإيدز ، ولذلك تعتبر

هذافا للعلاج المضاد للفيروس ، وفيروس الإيدز صغير جدًا ولا يحتوى إلا على جينات قليلة ، والتي قد تجعل من السهل إيجاد عقارات مؤثرة له .

والمعرفة المتزايدة لوظائف فيروس الإيدز وبروتيناته ، تحمل فى طياتها وعودًا مبشرة بإمكانية التعرف على العوامل التى تتدخل معه فى النهاية ، ولما كانت الوظائف البروتينية فريدة بالنسبة للفيروس ، فلن يؤثر التدخل فى أنشطتها بدرجة سيئة على المريض الذى يجرى علاجه ، إن النجاح فى مقاومة فيروس الإيدز ، عندما يأتى لن يكون سريعًا .

جبهة جديدة فى العقاقير الدوائية

A new frontier in pharmaceuticals

ليست التكنولوجيا الحيوية مجرد أداة أتاحت تعجيلًا هائلًا فى اكتساب معرفة بالأمراض البشرية ، لكنها أيضًا وسيلة لإنتاج البروتينات ومشتقاتها ، التى تلعب أدوارًا مهمة فى النظم الفسيولوجية المصابة ، وقد فتح جمع ثمار الفهم الأساسى للمرض ، وتوفر البروتينات المنظمة الفعالة جبهة جديدة مثيرة فى البحث الدوائى والطب البشرى .

المرحلة الأولى :

استخدام البروتينات الطبيعية والبيبتيڊات كعقاقير دوائية

Stage I : Natural proteins and peptides as pharmaceuticals

يبدأ حاليًا الاستخدام الدوائى للعصور المطعمة من البروتينات الطبيعية البشرية فى الوفاء بما وعدت به التكنولوجيا الحيوية فى مجال الصحة ، وأول هذه البروتينات ، هو الأنسولين البشرى المطعم وهرمون النمو البشرى ، اللذان وافقت عليهما هيئة الأغذية والدواء الأمريكية للاستخدام البشرى ، ولا يفى هذان العقاران ببعض الاحتياجات المكتشفة حديثًا ، لكنهما يحلان محل البروتينات الطبيعية .

وحتى ذلك الوقت الذى تم فيه استئساخ الجينات من أجل الهرمونات ، فقد كان يأتى المصدر الوحيد للأنسولين عن طريق عزله من الماشية والخنازير ، ولا يمكن الحصول على هرمون النمو البشرى إلا من الغدة النخامية لجثث الموتى ، ويستخدم كلا الهرمونين فى تصحيح العيوب : يستخدم الأنسولين لمرضى البول السكرى ، الذين فشل بنكرياسهم فى صنع هذا الهرمون ، ويستخدم هرمون النمو البشرى لعلاج القزمية ، التى تظهر نتيجة فشل الغدة النخامية pituitary gland فى إفراز هذا الهرمون

ويوفر الأنسولين البشرى المطعم الذى طوره إيلى ليلى وزملاؤه مورد كاف من هذا الهرمون ، بصرف النظر عن مورد البنكرياس الحيوانى ، وسوف يستفيد منه أيضًا مرضى البول السكرى diabetes ، الذين أصبحت لديهم حساسية ضد الأنسولينات الحيوانية ، وسوف يتيح توافر هرمون النمو البشرى

المطعم،الذى أنتجته شركة جينتك أيضاً العلاج المثالى للأطفال الذين يعانون من القزامة النخامية pituitary dwarfism بسبب فشل الغدة النخامية،أوقصر القامة نتيجة لأسباب أخرى، وقد كان الهرمون متوفراً من قبل بكميات قليلة،ولذا كانت تكاليفه مرتفعة، بالإضافة إلى ذلك،يجرى تقييم هرمون النمو البشرى كى يستخدم فى الحماية من نقص البروتين،والاعتلال الذى يحدث نتيجة المرض الحاد وحالات الجروح.

وقد وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية FDA على هرمون النمو المطعم فى وقت مبكر،عندما تم سحب المادة الطبيعية البشرية من الاستخدام الإكلينيكى فى الولايات المتحدة،حيث كان يرتبط تعاطيه بمرض Creutzfeldt-Jacob، وهو اضطراب فيروسى بطيء المفعول، ينتج عنه تدهور دائم للجهاز العصبى، وقد أعلنت هذه النتيجة المأساوية لاستخدام منتج طبيعى من شأن ميزة الأمان الأساسية الموجودة فى المنتجات المطعمة.

وأثناء تطوير هرمون النمو المطعم،استطاع البحث الذى ساعدت عليه تقنيات جديدة التعرف على عامل منظم آخر من سلسلة هرمون النمو، ووجود عامل إفراز،الذى يكون مطلوباً من أجل استخراج هرمون النمو من الغدة النخامية،قد تم التفكير فيه لبعض الوقت، ومن خلال الطرق المتقدمة لتتقية وتسلسل وتخليق البروتينات،استطاعت مجموعات روجر جويلمن ومجموعة وايلى فال فى معهد سالك فى لا جولا بكاليفورنيا، أن تتوصل أخيراً فى عام ١٩٨٣ إلى عزل عامل إفراز هرمون النمو (GRF)،الذى أنتج بمقادير ضئيلة من تحت السرير البصرى فى الدماغ المتوسط.

والعيب الكيميائي الحيوي الحقيقي وراء معظم حالات القزمية الناتجة عن قصور الغدة النخامية، هو غياب عامل إفراز هرمون النمو، والمرضى المصابون بغياب هذا العامل، يمكن أن تنتج أجسامهم هرمون النمو بصورة طبيعية في الغدة النخامية لكنه لا يفرز، وحالياً وبعد أن تم التعرف على عامل الإفراز، وأصبح من السهل إنتاجه، فسوف يحل بشكل نهائي محل هرمون النمو كعلاج طبيعي ومفضل لمعظم عيوب النمو.

وسوف تستفيد الأمراض الأخرى التي نجمت عن قصور بروتينات معينة من الاستخدام العلاجي للبروتينات المطعمة أيضاً، وهناك مثال مهم، ألا وهو الهيموفيليا haemophilia، وهو العيب الوراثي لعدم تجلط الدم، الذي يسببه نقص بروتين يعرف باسم معامل VIII. ولوقف نزيف الدم، يجري علاج مرضى الهيموفيليا بمعامل VIII طبيعي، ويتم تحضيره من الدم البشري، ونتيجة لذلك، أصبح معظم مرضى الهيموفيليا مصابين بفيروس الإيدز، الذي كان موجوداً في مستحضرات معامل VIII الملوثة، وعلى الرغم من أن الطرق الحديثة لإخماد نشاط الفيروس قد حسنت كثيراً من أمان المادة الطبيعية، إلا أن توفر معامل VIII المطعم، سوف يهدىء من خوف مرضى الهيموفيليا من الإصابة بالإيدز، الذي يعتقد مرضهم بطريقة مأساوية.

وقد تم التعرف على العيوب الجزيئية الكامنة وراء العديد من الأمراض الوراثية، وتشمل بعض من هذه الأمراض مثل Tay-Sachs و Gaucher's و Fabry's قصور في إنزيمات نتجت عن تراكم غير طبيعي للمواد التي كانت ستهدم لولا غياب الإنزيمات، وقد يستفيد الأشخاص المصابون ببعض الأمراض

يضاً من الحقن بـصور مطعـمة من الانزيمات، هذه الأمراض والأمراض وراثية الأخرى قد تستفيد أيضاً من العلاج الجيني الذي يتم فيه إجراء هندسة وراثية لخلايا بعض المرضى، لإنتاج الإنزيم المفقود (انظر الفصل الخامس عشر).

وإستخدام الصور المطعـمة من بروتينات التنظيم الحيوى الطبيعى لزيادة الاستجابات الفسيولوجية الطبيعية للأمراض، تعتبر فئة ثانية من تطبيقات المرحلة الأولى، فقد وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية بصفة مبدئية على إنترفيرون الكرية البيضاء المطعم، لاستخدامه ضد أمراض الأورام الخبيثة النادرة، التى تسمى بـليوكيميا الخلية الشعرية hairy cell leukaemia، بينما يعتبر العامل مؤثراً أيضاً فى الأورام الأخرى، التى تشمل مرض Kaposi's sarcoma المرتبط بالإيدز، وسرطان الخلية الكلوية renal cell carcinoma والورم الأسود الخبيث malignant melanoma، ويعطى الإنترفيرون معدل استجابة تصل حوالى ٩٠% للمرضى المصابين بسرطان الدم، بينما كانت العلاجات السابقة غير مؤثرة إلى حد كبير.

لا يعرف على وجه التحديد كيف يعمل الإنترفيرون على انحسار الأورام، فعامل (الإنترفيرون) يعمل على كبح انتشار بعض مجموعات الخلية الورمية فى المزرعة، ويعجل من نشاط الخلايا الطبيعية المهاجمة، التى تعتبر جزء من دفاعات الجهاز المناعى ضد الأورام، وكان الفحص الدقيق للإنترفيرونات من أجل العلاج السرطانى إلى حد كبير عملية تقديرية، فالدراسات التى أجريت على الفئران أو الحيوانات الأخرى الحاملة للورم، لم تترجم بصورة جيدة إلى علاجات للمرضى من البشر.

ولا يعتبر إنترفيرون الكرية البيضاء Leucocyte interferon، البروتين المطعم الوحيد، الذى جرى تقييمه لعلاج السرطان، فالتجارب التى أجريت على العوامل الأخرى، إما بمفردها أو بالاشتراك مع صور أخرى من العلاج، قوبلت بالنجاح وبحماس كبير من باحثى الأوراكلىنكيين، على الرغم من أن آليات تأثير العوامل، لم تكن مفهومة بشكل كامل.

وطوال مسيرة البحث الدوائى، تم تجريب مواد فعالة، ووجد أنها على درجة كبيرة من الفاعلية لعلاج الأمراض، قبل أن نفهم علاقة تأثيرها على الآلية الأساسية لهذه الأمراض، ومنمما كان يحدث تماماً مع الفحوصات الدقيقة للمزيد من الدوائيات التقليدية، فيجب ألا تقتصر أبحاث السرطان الإكلينيكية بواسطة الإنترفيرونات والسيتوكينات المطعمة فقط على التعرف على العلاجات المفيدة، بل يجب أن تساعد أيضاً على توضيح بيولوجيا ومناعة السرطان.

وإنترليوكين-٢ من بين العوامل الإضافية الأخرى التى جرى فحصها، وهو بروتين تنتجه خلايا T فى الجهاز المناعى، وهو منشط مهم لاستجابات خلايا T، وقد أدى استئساخ جين إنترليوكين-٢ البشرى إلى توفر البروتين المطعم لدراسته معملياً، ولدراسته فى الحيوانات الصغيرة، وعلاوة على ذلك، فبسبب فعاليته كمحفز مناعى، يجرى اختباره إكلينيكي أيضاً لعلاج الإيدز والسرطان، ويعد إنترليوكين-٢ المطعم بأن يكون علاجاً لسرطانات معينة لم تقلح معها أشكال العلاج الأخرى.

أحد أنواع العلاجات الذى يقوم بتطويره ستيفن روزنبرج وزملاؤه فى معهد السرطان القومى فى بتسدا، بولاية مريالند، كان له بشير نجاح خاص فى الدراسات الأولية ضد الأورام الصلبة المتقدمة التى قاومت صور العلاج

لأخرى، وفي طريقة العلاج هذه ، تؤخذ من مريض خلايا دم بيضاء، وتنشط بتعريضها لإنترليوكين-٢ فى المزرعة، ثم يعاد حقنها فى المريض مع مزيد من البروتين. وقد انحسرت نسبة الأورام حوالى ٤٥% فى ٥٥ شخصاً تلقوا هذا العلاج، وظهر أن خمسة أشخاص تعافوا من الورم، ومع ذلك ،فالتأثيرات الجانبية للعلاج بالإنترليوكين-٢ قد تكون شديدة — فقد مات عدد قليل من المرضى نتيجة لذلك — وطريقة العلاج معقدة ومكلفة ، وإذا دعمت النتائج الأولية للطريقة بفحوصات أخرى،فسوف نقود الحاجة إلى العلاج إلى إجراءات أبسط وأقل تكلفة، مع التقليل من التأثيرات الجانبية الشديدة.

والبروتين الطبيعى الآخر،الذى يعد بنتائج مبشرة جداً فى الأبحاث الإكلينيكية،هو منشط نسيج مولد البلازمين (TPA)،وهو إنزيم بشرى يذيب جلطات الدم من خلال تحويل مولد البلازمين إلى بلازمين، والبلازمين،هو إنزيم آخر يعمل على هدم بروتين الفبرين،الذى يعتبر عنصراً أساسياً فى جلطات الدم، ويستخدم حالياً أنزيما يوركيناز وستربتوكيناز إكلينيكية فى إذابة التجلط ، وهما ينشطان أيضاً البلازمين،ولكن يقومان بذلك بطريقة ما بحيث يدمران كلاهما جلطات الفبرين غير الذائبة ومولد الفبرين الذائب فى الدم،الذى ينتج الفبرين،والذى يكون مطلوباً للحفاظ على سلامة نظام التجلط.

وينشط الـ TPA البلازمين غالباً عند جلطات الفبرين، ولذلك فإنه ذو تخصصية شديدة، وله ميزة إضافية فى كونه يسهل إعطائه بالحقن فى الأوردة،بينما يفضل أن يعطى اليوركيناز والإستربتوكيناز عن طريق قسطرة مباشرة إلى موقع التجلط، وإذا قُمت التجارب الإكلينيكية براهين أخرى على فعالية الـ TPA، فقد يؤدى العلاج به فى يوم ما إلى تغيير جذرى حاد فى

علاج مرضى السكتة القلبية، وقد يكون الإنزيم الأول فى سلسلة الإنزيمات المستخدمة فى زيادة آليات التخلص من جلطات الدم.

تقترب المرحلة الأولى من البحث الموجهة نحو الاكتشاف والتشخيص الكيميائى الحيوى والتقييم البيولوجى للبروتينات البشرية الطبيعية للأغراض الطبية، بأية حال من نهايتها، وبالإضافة إلى البروتينات القليلة التى تم تشخيصها جيداً حتى الآن، فلا يزال هناك مخزون من البروتينات المنظمة الحيوية تحتاج إلى فهمها ، وهى الإنزيمات المنظمة الحساسة ، والمستقبلات التى قد تعمل كمرشحات (لهذا الدور) أو أهداف لعلم المدلواة.

وعلى الرغم من أنه قد يكون للبروتينات البشرية المطعمة التأثيرات الدوائية المرغوبة، إلا أنها ليس من الضرورى أن تناسب بشكل مثالى استخدامها كعقاقير، وغالباً ما تصنع البروتينات فى الجسم للموقع الذى تستخدم فيه، ولها عادة أنصاف عمر قصيرة جداً، والحاجة إلى إعطاء البروتينات عن طريق الحقن (تتحطم البروتينات فى القناة الهضمية، ولذا لا تعطى بطريق الفم)، وفترات بقائها القصيرة، خصيصتان لا تحبذان استخدامها كأدوية.

ويقدم عامل إفراز هرمون النمو، مثلاً لهذه الحالة، فإنه يخلق فى منطقة (ماتحت السرير البصرى) hypothalamus ، وينقل لبضعة سنتيمترات فى الغدة النخامية pituitary gland حيث يبدأ مفعوله، وبالرغم من أن عامل إفراز هرمون النمو GRF يدمر بسرعة فى الدم، فإن تركيزه فى الغدة النخامية يعتبر كافياً لتنظيم النمو والتوازن النتروجينى للجسم، عن طريق السيطرة على إفراز هرمون النمو، ويعمل عامل إفراز هرمون النمو بصورة طبيعية أيضاً منسجماً مع عوامل التحكم السالبة، مثل هرمون سوماتوستاتين somatostatin للحفاظ على

إفراز هرمون النمو بمستويات صحيحة، ولا يتم الحصول على التوازن الدقيق للعوامل المضادة عند إعطاء هرمون النمو المطعم بطريق الحقن، لكنه يتحقق تماماً من خلال العلاج بعامل إفراز هرمون النمو.

وهناك طريقتان مختلفتان يجري استخدامهما لتحسين العلاج بعامل إفراز هرمون النمو والبروتينات المطعمة الأخرى، وهاتان الطريقتان هما تعديل المعامل نفسه لجعله أقل عرضه للتحلل، وتطوير نظم جديدة لإدخال العوامل، وسوف يؤدي إثبات فاعلية العلاج البروتيني للمزيد من الأمراض إلى الابتكار التكنولوجي المطلوب للوصول إلى نظم توصيل، تستطيع أن تقدم بروتينا في المكان والزمان المطلوبين فيه.

والإفراز البطيء للمادة التي تم تغليفها بغلاف من البولمر أو في تركيبات غشائية تعرف بالليبوسومات، تعد إحدى هذه الإمكانيات، والإمكانية الأخرى، هي تطوير الأجهزة التي يتحكم فيها الكمبيوتر لتوصيل الدواء، وسيكون في الإمكان في النهاية التغلب على مشاكل أنصاف العمر القصيرة، والحاجة إلى إعطاء الدواء بطريق الحقن.

المرحلة الثانية :

استخدام بروتينات وبيبتيدات معدلة طبيعياً كعقاقير دوائية

StageII:

Modified natural proteins and peptides as pharmaceuticals

يتضمن المسار التقليدي لاكتشاف الدواء، استخدام النماذج التجريبية للتعرف على العوامل، سواء كانت طبيعية أو تخليقية، ويكون لها تأثيرات مرغوبة، وثبت أن معظم الجزيئات التي تم التعرف عليها من خلال هذا المسار، غير ملائمة للاستخدام كدواء، إما لأنها ليست فعالة بدرجة كافية، أو موجودة في الكائنات الحية، أو لأن بها مواد سمية، أو من الصعب تخليقها.

إلا أن هذه الجزيئات تعمل كأدلة مهمة للكيميائي التخليقي، في أن تركيباتها قد تقترض متطلبات تركيبية معينة، تضيف نشاطاً مرغوباً للجزيء، ويمكن استخدام المعلومات في إنشاء أنواع مختلفة من الجزيء الأصلي، التي ربما عندما تختبر ، تحدد فيما بعد العلاقة بين التركيب والنشاط الدوائي، وقد استخدمت هذه الطريقة مرات عديدة لترتقى بمركب أولى له مظهر نشاط دوائي مرغوب إلى عقار آخر فعال.

وتقدم التكنولوجيا الحيوية مساراً موازياً متميزاً للمسار الأكثر تقليدياً لتصميم العقار، فقد انتجت أصناف جديدة من الدلائل - البروتينات النشطة دوائياً والموجودة بصفة طبيعية، وقد أضافت التكنولوجيات أيضاً، نوعاً جديداً من كيمياء الجزيئات الكبيرة التي يمكن أن تعدل بداخلها الجينات ، بحيث يمكنها إنتاج بروتينات متغيرة، تعتبر أكثر ملاءمة للاستخدام الدوائي عن الجزيئات الأصلية (جدول ٤-٢).

المرحلة الأولى	صنع بروتينات طبيعية مثل: الإنترفيرونات الإنترليوكينات منشط نسيج مولد البلازمن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ
المرحلة الثانية	صنع بروتينات طبيعية معلة : الجيل الثانى والثالث من منشط نسيج مولد البلازمن الأجسام المضادة المهجنة من الإنسان-الفار
المرحلة الثالثة	إنشاء محلكيات تخليقية من البروتينات الطبيعية

والمثال الرائع على هذه المرحلة الثانية من توجيه تعديل البروتين، هو الجهد المبذول لتطوير جزيئات TPA الجيل الثانى، وجزيئات الإنزيمات المنظمة بصورة دقيقة مثل TPA، تنقسم إلى مناطق وظيفية تسمى "الحقول"، بحيث يمكن الحصول على التنظيم الفعلى من خلال ارتباط عوامل تحكم أخرى، وعلى سبيل المثال، فلـ TPA حقل موقع نشط، يحفز تحويل مولد البلازمين إلى بلازمين، والذي يدمر حينئذ جلطات الفبرين، ويضفى حقل آخر للـ TPA على الإنزيم تخصصه لتنشيط البلازمين عند جلطات الفبرين، ولا يزال يوجد حقل آخر للـ TPA، وهو موقع ارتباط مادة (أو مواد) كابحة طبيعية.

ولما كانت فترة نصف العمر البيولوجية للـ TPA قصيرة جداً، فإن جرعات وفيرة من البروتين تكون مطلوبة للحصول على إذابة جلطة مؤثرة، وعلاوة على ذلك، يتطلب التركيب المعقد للجزيء أن ينتج فى خلايا حيوانية، وفى خلايا ميكروبية، مثل خلايا أ.كولاي، وهى الاختيار الطبيعى لإنتاج

البروتينات المطعمة،يجرى صنع الـTPA بصورة صحيحة بالنسبة إلى تسلسل حمضه الأميني الأولى، فى حين تتكون الجسور المتبادلة للدياسلفايد بطريقة غير سليمة،ولا ينطوى البروتين بصورة سليمة.

ولما كان الـTPA المصنوع فى الخلايا الحيوانية مكلفاً جداً، فمن الأفضل تقليل المقادير التى يجب أن تعطى، عن طريق زيادة ثبات البروتين وتقليل حساسيته للكايح الطبيعى، وسيكون صورة من الـTPA ذات فترة نشاط أطول مفيدة أيضاً فى منع تكون جلطات ثانوية،والتي تعتبر شيئاً طبيعياً بعد علاج حاد بالعامل. ويجرى بذل جهد كبير فى إعادة نمذجة جزيء TPA على طول هذه المسارات للوصول إلى مستحضر دوائى أكثر ملاءمة.

والبيبتيديات peptide أصغر من البروتينات،ويمكن صنعها بواسطة الكيمياء التخليقية،فضلاً عن الحصول عليها من تعبير الجينات المطعمة، وكانت البيبتيديات منذ وقت طويل مستهدفة للتعديل،والعديد من العوامل الدوائية التجارية الموجودة، هى صور من البيبتيديات الطبيعية التى تم تغييرها للوصول إلى فترة تأثير سريعة.

ولا يقتصر تخليق الببتيد على استخدام حمض أميني طبيعي،كما فى حالة إنتاج البروتينات المطعمة من الخلايا الحية، والعديد من التعديلات ممكنة والتي تجعل من البيبتيديات ثابتة بقدر كاف لكى تعطى عن طريق الفم، ويمكن محاكاة مراكز النشاط لبعض البروتينات الكبيرة المنظمة حيويأً بواسطة بيبتيديات تخليقية،وهو التقدم الذى يؤدى إلى المرحلة الثالثة من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية فى مجال علم العقاقير.

لمرحلة الثالثة :

استخدام محاكيات من البروتينات المنظمة الحيوية الطبيعية كعقاقير دوائية

:Stage III

Mimetics of natural bioregulatory proteins as pharmaceuticals

تبذل جهود ملموسة في الوقت الراهن لتطوير القدرة على تقليد النشاط البيولوجي للبروتينات بواسطة جزيئات عضوية ، تكون خالية من روابط الببتيد غير المستقرة ، ويمكن تناولها عن طريق الفم ، ويتأسس هذا البحث على إدراك أن البروتينات تتفاعل مع بعضها البعض ومع جزيئات أخرى خلال أجزاء محددة بدرجة شديدة ومحدودة المسافة على أسطح البروتينات ، ويعطى بقية تركيب البروتين الدعامة الكلية للحقول العديدة عن طريق ربطها معاً في تكامل وظيفي متماسك .

ويتطلب تطوير محاكيات بروتينية مناسبة ، تحديد التركيبات الفراغية المفصلة للبروتينات النشطة حيويًا ، بحيث يمكن فهم تفاعلاتها بالتفصيل الدقيق ، وعلى التوازي ، وإسهامًا في هذا الفهم ، توجد دراسات متغيرات عديدة للبروتين التي تغيرت تفاعلاتها وأنشطتها البيولوجية ، وبجمع نتائج هذه الأبحاث ، يمكن تكوين تصور واضح عن السمات التركيبية المهمة للتفاعلات الوظيفية لبروتين .

وخلال تطوير تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم ، كان هناك تقدم ملحوظ في تكنولوجيا تحديد التركيبات الفراغية لجزيئات البروتينات الكبيرة، ومن أبرز هذه التكنولوجيات ، أوجه التقدم التي حدثت في الجانب النظري وفي تطوير الآلات لتحديد تركيب البروتين بواسطة دراسات البلوريات بالأشعة السينية ، وعن طريق استخدام مصادر الإشعاع الجديدة، فإن الكواشف المعقدة التي عجلت

بشكل هائل الحصول على البيانات وإمكانات أجهزة الكمبيوتر وبرامجه، جعل كل هذا من الممكن الحصول على تركيب فراغى لبروتين نموذجى منظم حيويًا فى غضون سنة واحدة.

والقيد الأساسى فى طرق دراسة البلوريات بالأشعة السينية البلورية X-ray crystallographic methods أبقى على الحاجة إلى إعداد بلورات بروتينية بجودة كافية من أجل التحليل، والتي كانت لا تزال مجرد فن عن أن تكون علماً قائماً، ولم تقدم التكنولوجيا الحديثة دعماً كبيراً لحل هذه المشكلة.

ومطيافة الرنين المغنطيسى النووى شديد المجال High-field nuclear magnetic spectroscopy، التى تتيح لعالم بأن يحدد تركيبات الجزيئات فى المحلول، هى أسلوب ثان فى مرحلة تقدم، وتقتصر هذه التكنولوجيا حالياً على جزيئات أصغر من معظم البروتينات النشطة حيويًا، لكنها تتطور مع تطور المزيد من الأجهزة القوية.

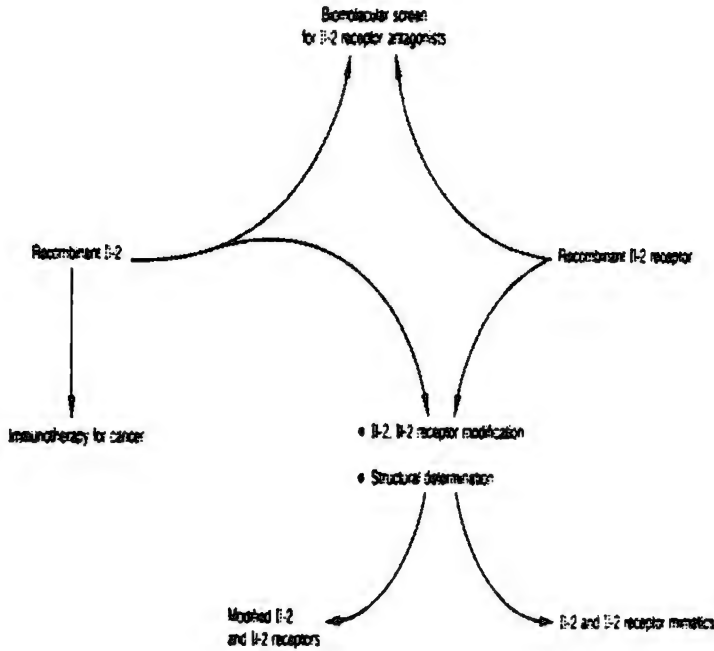
وأخيراً، فإن طرق الكمبيوتر المستخدمة للتنبؤ بالتركيبات الفراغية للبروتينات، إما من تسلسلات أحماضها الأمينية، أو من تركيبات معروفة لجزيئات شبيهة بها، أخذت فى التطور حيث أصبحت تتوفر أجهزة كمبيوتر قوية، ويستخدم هذا المدخل أيضاً الذى يلتقى مع التكنولوجيا الحيوية وتكنولوجيا الكمبيوتر وجهاً لوجه أساليب الصور الجزيئية الحديثة التى تتيح للعلماء رؤية جزيئات كبيرة فراغية على شاشة التليفزيون، لتعديل التركيب ولنمذجة التفاعلات بين الجزيئات، وسيكون هذا الأسلوب عظيم النفع، لأنه يمكنه عرض التركيبات الفراغية للبروتينات المطعمة.

أدوات جديدة للاكتشاف الصيدلي

New tools for pharmaceutical discovery

على الرغم من أن هذا الفصل قد تركز على التطبيقات العلاجية المباشرة للبروتينات المطعمة ومشتقاتها ومحاكياتها، فقد يوفر الاستخدام غير المباشر للأشكال المطعمة من البروتينات الطبيعية أيضاً فرص لاكتشاف عوامل صيدلية جديدة (شكل ٤-٥)، وعلى سبيل المثال، فإن كل من إنترليوكين-١ وإنترليوكين-٢، الذى يحفز كلاهما الاستجابات المناعية الطبيعية بدرجة كبير جداً، يحدثان تأثيرهما بواسطة التفاعل مع بروتينات متقبلة شديدة التخصص توجد على أسطح الخلايا المستهدفة، وتبطل العوامل التى توقف نشاط هذه التفاعلات الاستجابات المناعية، وقد تكون مفيدة علاجياً فى منع رفض استزراع العضو أو علاج حالات، مثل التهاب الجلد الذئبى النظامي systemic lupus erythematosus، والتهاب المفاصل الروماتزمي rheumatoid arthritis، الذى يكون فيهما الجهاز المناعى مفرط النشاط.

وهناك مدخل جديد للتعرف على العوامل المضادة لهذا الإنترليوكين، يستخدم صورا مطعمة من الإنترليوكينات ومتقبلاتها فى اختبارات منتقاة وشديدة الحساسية، للكشف عن العوامل التى توقف تفاعلاتها، ولما كانت الاختبارات تجرى بواسطة الكمبيوتر وأتوماتية التشغيل، فإنها تسمح باختبار أعداد ضخمة من العوامل المختارة بشكل عشوائى (شكل ٤-٦)، ويمكن فحص المركبات العضوية المخلفة، أو خلطات المواد المعقدة الموجودة فى وسائط نمو الكائنات المجهرية، من أجل النشاط العوامل المضادة للإنترليوكين بواسطة طرق جديدة.



شكل ٤-٥ . طرق استخدام إنترليوكين-٢، بومتيبل إنترليوكين-٢ المطعم، إنترليوكين-٢ (٢-١١) المطعم بجرى استخدامه بصورة مباشرة فى العلاج التجريبى المناعى للسرطان، وهناك جهود تبذل أيضا للحصول على فهم أفضل للعلاقة بين تركيبات البروتينات وتحشطنها، مع فكرة إنتاج كل من صور البروتينات الطبيعية المعطلة، والمركبات التخليفية التى تحاكى تأثيراتها. وبهذه الطريقة فقد يكون من الممكن تجهيز عوامل واثقة جديدة التى تعتبر أكثر فاعلية، أو لها سلسلة خصائص مختلفة عن العوامل الأصلية. وقد يمكن استخدام الجزيئات المطعمة أيضا بصورة غير مباشرة كأساس لاختبار من أجل التعرف على العقاقير التى توقف ارتباط إنترليوكين-٢ بمتقبله ولذلك قد تكون مفيدة فى إبطال الاستجابات المناعية فى المرضى، الذين بجرى لهم نقل أعضاء والذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية .



شكل ٤-٦. الفحص الأتوماتي للعقاقير التي تعيق ارتباط إنترليوكين-١ وإنترليوكين-٢ بمتقبلاتهما، والجهاز معد من أجل فحص نشاط ٤٠٠ عينة مختلفة، مرتين ، في ثلاث اختبارات آتية ، والاختبارات من أجل التداخل في الارتباط بين إنترليوكين-١ وإنترليوكين-٢ ، واختبارات الجلوبيين المناعي مع متقبلاتها، ويظهر الروبوت الذي يقوم بالعمليات في واجهة الصورة ويمتد ذراعه للخلف إلى أعمدة الأنواح، ويظهر الكمبيوتر الذي ينظم سير العمل في خلفية الصورة.

ويحتوى الصود ثلاث من اليمين على الأنواح والعينات الجارى تحليلها ويحتوى الصود الأول والثلى وقرايع من اليمين على ألواح بها مواد الاختبار، ويوجد بكل طبق ٩٦ عينة تحمل العينات أو مواد الاختبار، وتصل يد الروبوت ٩٦ من الأطراف الأتويصة الجاهزة، التي تنقلها من الأطباق فى الساروتستخدم لسحب المادة من العيون فى طبق العينة وتضعها فى أطباق لكل من الاختبارات الثلاثة.

والمركبات التي يوجد لها نشاط، يمكن إن لم تستخدم بطريقة مباشرة

إخضاعها لتعديلات كيميائية نظامية لإنتاج عقاقير شديدة التخصص تناسب

الاستخدام الأدمى، ولما كان من غير المحتمل أن تكون الجزيئات النشطة

بروتينات، ونتيجة لذلك تكون ذات تعقد تركيبى طيع، فإن هذا المدخل جميعه يتناسب مع الإجراءات الثابتة فى الكيمياء الطبية.

تكمّن روعة طرق الفصل الجديدة فى قدرتها على عمل اختيار منطقى للعناصر التى تستخدم كأساس للاختبارات المستخدمة، وقبل أن توجد تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، كان فصل هذا النوع غير ممكّن، إما لأن الآلية الأساسية للأمراض لم تكن مفهومة، أو أنه لم يكن الحصول على الجزئيات العضوية المعينة المستخدمة فى الآلية بكميات وفيرة، وبإسهام التكنولوجيا الحيوية فى كلا المجالين، أصبح من الممكن حالياً استنباط إجراءات أكثر منطقية لفحص العقاقير الجديدة.

الخلاصة

بدأت التكنولوجيا الحيوية تؤثر بشكل قوى على الصحة البشرية، وقد تركز هذا الفصل على سمة محددة نسبياً: تأثير التكنولوجيا الحيوية على اكتشاف العوامل العلاجية الجديدة، وقد ناقشنا أيضاً، الزيادة السريعة فى اكتساب المعرفة المتعلقة ببيولوجيا الحياة، ولا يمكن حصر التأثير الإيجابى لهذه المعرفة المتزايدة التى تركزت على تحسين الصحة ، وعلى الرغم من أنه من الممكن التنبؤ بنوع العلاجات التى تستمد من تطبيقات التكنولوجيات الجديدة المبنية على مستوى الفهم الحالى، فإنه يصعب التكهن التنبؤ بما سوف تؤديه المعرفة فى تغيير الدواء فى المستقبل البعيد.

يبقى هناك شيء واحد مؤكد، وهو أن التكنولوجيا الحيوية تقود التغير فى مجال الطب والصحة البشرية، فإن هذا التغير يجرى بخطوات سريعة جداً عما كان يحدث فى الماضى. ولذا، يمكن القول بأن التكنولوجيا الحيوية، فتحت جبهة جديدة فى مجال الصحة.

الفصل الخامس:

الإنتاج الميكروبي للمواد الكيميائية الحيوية

The microbial production of biochemicals

ظلت الكائنات المجهرية لفترة طويلة من الزمن الدعائم الأساسية لإنتاج المواد الكيميائية، نظراً لأحجامها، وطرق معيشتها، وتعدد استعمالاتها، وتؤلف الخلايا الميكروبية أنواعاً عديدة من المركبات، تتراوح ما بين سكريات بسيطة نسبياً، وأحماض أمينية، إلى مضادات حيوية وأصبغ أكثر تعقيداً، وإلى بروتينات، وسكريات عدادية غاية في التعقيد .

وبنفس الدرجة تتعدد الأنشطة البيولوجية للمنتجات الميكروبية، فهي توفر أنواعاً عديدة من العقاقير، تشمل المضادات الحيوية antibiotics، التي أحدثت تغييرات جذرية في علاج الأمراض المعدية infectious diseases والعوامل التي تعيق نمو الأورام وتستخدم في العلاج الكيميائي للسرطان cancer chemotherapy والعوامل المضادة للالتهابات لعلاج التهاب المفاصل والأمراض المتصلة بها، والأدوية التي تخفض من ارتفاع ضغط الدم، والمهثئات والأدوية الأخرى التي تؤثر على الجهاز العصبي، وتوفر الميكروبات أيضاً العديد من الإنزيمات المستخدمة في الغذاء، والصناعات الكيميائية والدوائية، ومع ذلك فإن هذه المواد الكيميائية ليست جميعها بذات أهمية تجارية، إلا أنه يمكن تحسين إنتاجها في بعض الحالات إذا ظهرت لها أهمية تجارية.

يوضح جدول ٥-١ تنوع المنتجات الميكروبية، ويبين أنه يمكن أن تصنف، إما تبعاً لمميزاتها الكيميائية أو الوظيفية، على الرغم من أن التصنيفين قد

يتداخلان، وعلى سبيل المثال، فلعديد من الأملاح العضوية نكهات تجعلها مفيدة في صناعة الأغذية، أو في صناعة مستحضرات التجميل، وجميع الإنزيمات عبارة عن بروتينات.

جدول ٥-١ المواد التي تصنعها الكائنات المجهرية

أنصاف كيميائية	أنصاف وظيفية
أشباه القلويت	مضادات حيوية
أحماض أمينية	نكهات
مواد كربوهيدراتية	عقار بخلاف المضادات الحيوية
استرات	إنزيمات
ليبيدات	مثبطات إنزيمية
أحماض نووية	مكسبات النكهة
أحماض عضوية وكحوليات	معجلات النكهة
	بهتيدات
	هرمونات
	بروتينات
	مبيدات الآفات
	أصبغ
	خافضات التوتر
	فيتامينات

ولما كان إنتاج المواد الكيميائية عن طريق الكائنات المجهرية ، يستغل المعلومات الوراثية التي تمتلكها وتعبّر عنها هذه الخلايا الحية، فإن مجيء الهندسة الوراثية الحديثة قدم فرصاً كبيرة للتطوير التجارى للمنتجات الميكروبية، والقدرة على تغيير التركيب الوراثي genetic composition لكائن

مجهرى ،إما عن طريق تعديل جيناته أو عن طريق إدخال جينات غريبة،سيكون له تأثير كبير على إنتاج المواد الكيميائية من الكائنات المجهرية.

الإنزيمات : مواد حفازة للتخليق الحيوى ولتحويل المواد العضوية إلى مواد أخرى

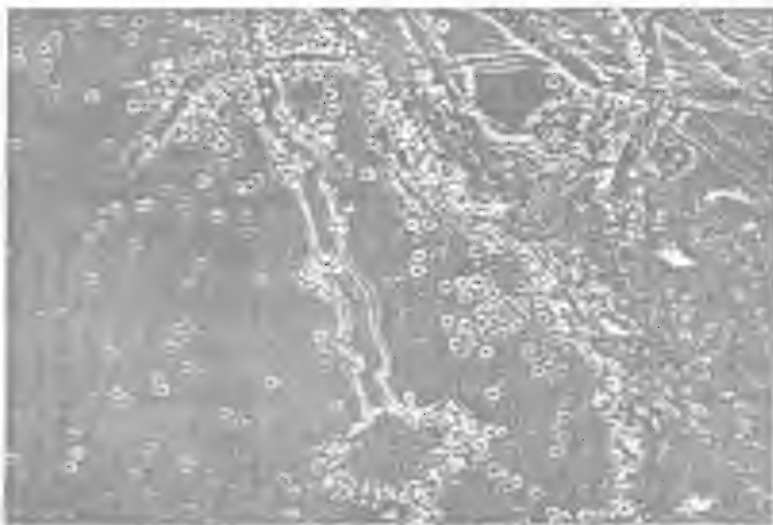
Enzymes: catalysts for biosynthesis and degradation

الإنزيمات هي المواد الحفازة التى تقوم بكل التفاعلات التخليقية والهدمية للكائنات الحية، وعلى الرغم من أنه يمكن الحصول على الإنزيمات من الحيوانات والنباتات وكذلك الكائنات المجهرية ، إلا أن الإنزيمات المستخرجة من المصادر الميكروبية تعتبر بصفة عامة الأكثر ملاءمة للتطبيقات التجارية(شكل ٥-١)، هناك سبب واحد لهذا،هو أن المنتجات الميكروبية يمكن أن تنتج بكميات كبيرة دون قيود يفرضها الموقع الجغرافى أو أحد فصول السنة،كالإنزيمات المشتقة من أصل نباتى،على سبيل المثال، بالإضافة إلى ذلك، تنمو الكائنات المجهرية بمعدلات سريعة، وتكاليف إنتاجها منخفضة نسبيا.

ومما لا يثير الدهشة، نظراً لتنوع التخليقات التى يمكن أن تقوم بها الكائنات المجهرية ، فنجد أن الطبيعة قد حبتها بمخزون هائل من الإنزيمات التى تقوم بسلسلة كبيرة من التفاعلات، ويقدر عدد الإنزيمات الموجودة فى الطبيعة بحوالى ٢٥٠٠٠ إنزيمياً، ومع ذلك،فلا يزال معظم هذا العدد الضخم من الإنزيمات غير مستغل ، وقد تم عزل وتمييز حوالى ٢٠٠٠ من هذه الإنزيمات فقط ، ولا يستغل منها تجارياً سوى أعداد قليلة. ومع ذلك، فإن الكائنات المجهرية توفر الإنزيمات التى تؤثر على كل الجزيئات البيولوجية الرئيسة

(جدول ٥-٢)، وللعديد من هذه الإنزيمات تطبيقات تجارية فى صناعة الأغذية(انظر أيضا الفصل الثانى)، وكانت مبيعات الإنزيمات فى السوق العالمى عام ١٩٨٥ تزيد على ٥٠٠ مليون دولار أمريكى.

ويوفر حفز الإنزيمات، عدداً من المميزات التى تفوق طرق الحفز الكيميائية التقليدية، فالإنزيمات لها قوة حفزية عالية إذ تزيد من معدل التفاعلات الكيميائية بنسب تتراوح ما بين ٩١٠ إلى ١٢١٠، وعلاوة على ذلك، فهى تعمل فى ظروف معتدلة من درجات الحرارة، والأس الهيدروجينى، والضغط، وتظهر تخصصاً شديداً **high specificity** للمواد التى تؤثر عليها ، وغالباً ما تستطيع الإنزيمات التمييز بين الجزيئات وثيقة الصلة ببعضها، وأخيراً، وعلى الرغم من أن معظم الإنزيمات تعمل فى المحاليل المائية، إلا أن البعض منها يمكنه القيام بالأنشطة الحفزية فى المذيبات العضوية.



شكل ١-٥ صورة مصغرة لرشاشية *Aspergillus*. عفن من جنس الرشاشيات يغطي عدة منتجات، تشمل العديد من الإنزيمات التي تستخدم في تصنيع الأغذية و مواد كيميائية مثل أحماض الليمون والجلوميك، ويستخدم الطفن أيضاً في إنتاج مواد غذائية شرقية مخمرة مثل الساكي، والشويو، والميسو.

جدول (٥-٢) الانتاج الميكروبي للإنزيمات بواسطة التخمر .

Enzymes	Substrates	Microorganisms
Alpha-amylase	Starch	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Beta-amylase	Starch	<i>Bacillus polymyxa</i>
amylglucosidase (glucoamylase)	Dextrins	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus microsporus</i>
Cellulases	Cellulose	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Glucose isomerase	Glucose	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces olivochromogenes</i>
Glucose-1-oxidase	Glucose	<i>Aspergillus niger</i>
Pyranose-2-oxidase	Glucose	<i>Polyporus obtusus</i>
Alpha-glucosidase	Maltose	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Lipases	Lipids	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida cylindracea</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Rhizopus arrhizus</i>
Pectinesterase	Pectin	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
Proteinase, alkaline serine	Protein	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Proteinase, acid (pepsin-like)	Protein	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>
Proteinase, acid (rennin-like)	Protein	<i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i>
Proteinase, neutral Pullulanase	Protein Amylopectin	<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>

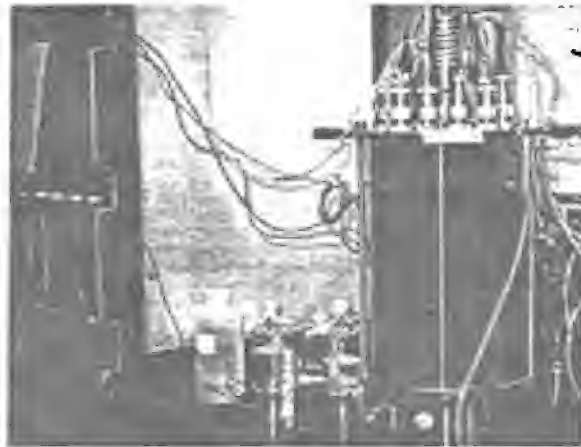
وعلى الرغم من هذه القدرات الهائلة، فلا توجد إنزيمات بلا عيوب في خليط التفاعل الأخير ما بين ٠,٥ % و ٢ % وبعد تقليل أو إزالة كلاً من هذه المعوقات في الاستغلال التجاري للإنزيمات هدفاً للكثير من الأبحاث الحالية، ويمكن التغلب على بعض الصعوبات الكامنة في استخدام الإنزيمات القابلة للذوبان بتثبيت الإنزيمات المعزولة، وبذلك تتحول إلى صور غير قابلة للذوبان، ويمكن تثبيت الخلايا كلها سواء كانت حية أو ميتة واستخدامها لإجراء تفاعلات معينة، وهذا يفيد على وجه الخصوص، عندما يحتاج التفاعل إلى مشاركة إنزيمات

ميكروبية عديدة، وتشمل مميزات مثل حركة الإنزيمات أو كل الخلايا على زيادة ثبات الإنزيم، وتقليل تكلفته، وسهولة فصله واستخلاصه.

إنتاج المواد الكيميائية عن طريق التخمير الميكروبي

The production of chemicals by microbial fermentation

التخمير بصفة عامة هو عملية تتم في دفعة واحدة abatch process ينمو فيها كائن مجهرى لم مثل حركته فى جهاز تخمر، وجهاز التخمير عبارة عن خزان أو وعاء كبير يحتوى على ميكروب فى وسط غذائى (شكل ٥-٢)، ويحتوى وسط النمو على مصدر كربونى كالجلكوز، أو النشا المتميىء أو المولاس، ومصدر بروتينى أو نروجين مثل وجبة فول صويا أو شراب ذرة تقيل أو وجبة بنرة قطن، أو مصدر فيتامين مثل خلاصة الخميرة، ومعادن ومواد غذائية متنوعة، ويزود جهاز التخمير أيضاً بوسائل تحكم لتنظيم درجة الحرارة والأس الهيدروجينى للحساء الذى ستنمو عليه الخلايا.



شكل ٥-٢ جهاز تخمر معلى. يجرى استخدام خزان المخمر الذى يتسع لـ ١٤ لتراً فى إنتاج ketogluconic acid ، وهو حمض عضوى على درجة غذائية ينتجه الفطر Acetobacter ، ويزود الجهاز بوسائل تحكم ومراقبة لتنظيم درجة الحرارة والأس الهيدروجينى وعملية إدخال الأكسجين والتغذية.

وكما هو معروف بصورة تقليدية، كانت التخمرات لا هوائية، في حين يحتاج العديد من تفاعلات التخمر حالياً إلى أكسجين، ومنتجات التخمر إما أن توجد بداخل الخلايا أو تفرز في الوسط، والعمليات المطلوبة لاستخلاص المنتج وتنقيته بسيطة إلى حد ما بالنسبة للمواد المفرزة.

وكما ذكرنا سابقاً، توفر التخمرات الميكروبية العديد من الإنزيمات التي تستخدم تجارياً، فالإنزيمات مثل البروتينات الأخرى، هي عبارة عن بوليمرات تتكون من ارتباط الوحدات البنائية للأحماض الأمينية ببعضها لتكوين جزيئات كبيرة، ومع ذلك فبعض الجزيئات الإنزيمية معقدة التركيب، لأنها تحتوي على عناصر أخرى من الكربوهيدرات أو الليبيد.

وتوفر الكائنات المجهرية أيضاً عدد من البوليمرات غير البروتينية (جدول ٥-٣). وكل المواد المدونة تقريباً سكريات عداية تكونت من ارتباط سكريات بسيطة مثل، الجلوكوز أو الفركتوز، والاستثناء هو بولي-بيتا-هيدروكسيبوتيرات، الذي يتركب من حمض دهني ذي أربع ذرات كربون يسمى بيتا-هيدروكسيبوتيرات، وتستخدم العديد من البوليمرات غير البروتينية في صناعة الأغذية كعوامل مستحلبة، وكمواد تضيفي الحجم أو النسيج للمنتجات الغذائية، وتستخدم أيضاً كقوالب غير قابلة للذوبان لشل حركة الإنزيمات والخلايا.

جدول ٥-٣ الإنتاج الميكروبيولوجي للبوليمرات عن طريق التخمر

Polymers	Microorganisms
Alginate	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cellulose	<i>Acetobacter</i> sp.
Curdian	<i>Agro bacterium</i> sp.
Dextran	<i>Acetobacter</i> sp.
D-Fructose homopolymer	<i>Zymomonas mobilis</i>
Levan	<i>Bacillus</i> sp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia marscens</i>
Phosphomannan	<i>Hansenula capsulata</i> <i>Hancenula holstii</i> <i>Physarumpolycephalum</i> <i>Rhizobium melilozi</i>
Poly-beta-hydroxybutyrate	<i>Alcaligeneseutrophus</i> <i>Methylobacterium organophilum</i>
Scieroglucan	<i>Sclerotium glucanicum</i>
Xanthan	<i>Xanrhomonas campestris</i>

وربما تكون المضادات الحيوية أكثر الجزيئات الأصغر أهمية التي تنتجها الكائنات المجهرية ، ومنذ أن اكتشف ألكسندر فليمينج^١ بالصدفة المضاد الحيوى البنسلين فى عام ١٩٢٨ ، فقد أحدثت هذه المعوقات الطبيعية للنمو الميكروبي تغييراً جذرياً فى الطب، وأنقذت حياة العديد من البشر (شكل ٥-٣)، والأمراض البكتيرية مثل التهاب الرئة pneumonia، التى يمكن أن تعالج حالياً بالمضادات الحيوية، لم تعد البلاء الذى كان موجوداً من قبل. بالإضافة إلى ذلك، فبعض

١- ألكسندر فليمينج: بكتيريولوجى بريطانى. مكتشف البنسلين عام ١٩٢٨.

المضادات الحيوية مثل الادريميسين **adrimycin** على سبيل المثال، لها تأثيرات مضادة للأورام، وتستخدم في العلاج الكيماوي للسرطان.

وحتى داخل التصنيف العام للمضاد الحيوى، فهناك عدة أنواع مختلفة من التركيبات الكيميائية، حيث يوجد ما يزيد على ٢٠٠٠ مادة مضاد حيوى، وقد دون عدد قليل منها فى جدول ٥-٤، تم التعرف عليها، وتشمل هذه الجزيئات على البيبتيدات، والكربوهيدرات والهيدروكربونات ومشتقات البنزين و سلسلة من الأنواع الكيميائية الأخرى، ولا تزال وظيفة هذه المركبات داخل الكائنات المجهرية التى تصنعها غير معروفة، وربما يكون الهدف منها مساعدة الكائن على الدفاع عن بيئته الذى يعيش فيها ضد الكائنات الغريبة الأخرى، وقتل الميكروبات الغازية، لكنه لا يحتمل أن تكون تلك هى الوظيفة الوحيدة.



شكل ٥-٣ صورة لظن البينسيليوم ينمو على طبق بالمعمل. و بعد الظن من هذا الجنس مصلداً للمضادات الحيوية من عائلة البينسيلين.

جدول ٤-٥ الإنتاج الميكروبيولوجي للمضادات الحيوية عن طريق التخمر

Antibiotics	Chemical classes	Microorganisms
Amphotericin B	Tetraene	<i>Streptomyces nod usus</i>
Cephalosporin C	Beta-lactani	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Chloramphenicol	Nitroaromatic	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Chlortetracycline	Tetracene	<i>Streptomvces aureofaciens</i>
Clavulanic acid	Beta-lactam	<i>Streptomvces clavuligerus</i>
Demeclocycline	Tetracene	<i>Streptom.vces aureofaciens</i>
Erythromycin	Macroide	<i>Streptomvces erythreus</i>
Gentamicin C	Aminoglucoside	<i>Micromonospora purpurea</i>
Gramicidins	Polypeptide	<i>Bacillus brevis</i>
Griseofulvin	Coumarone + Hydroaromatic ring	<i>Pen icillium griseofulvum</i>
Hydroxytetra- cycline	Tetracene	Streptomyces rimosus
Kanamycin A	Aminoglycoside	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Lincomycin	Amino acid + Carbohydrate	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Neomycins	Aminoglycoside	<i>Streptomycesfradiae</i>
Nystatin	Heptaene	<i>Streptomyces noursei</i>
Oleandomycin	Macrolide	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Paromomycin	Aminoglycoside	<i>Streptomyces rimosus forma paromomycinus</i>
Penicillins	Beta-Lactam	<i>Penicillium chiysogenum</i>
Rifamycins	Aliphatic + aromatic	<i>Nocardia mediterranei</i>
Streptomycin	Aminoglycoside	<i>Streptomyces griseus</i>
Sulfazecin	Beta-Lactam (monobactam)	<i>Pseudomonas acidophilus</i>
Tetracycline	Tetracene	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Tyrocidines	Polypeptide	<i>Bacillus brevis</i>

ويعد وجود مثل هذه السلسلة الكبيرة من المضادات الحيوية مكسبا للطب، والسبب الأول، هو أن الكائنات المجهرية الممرضة تتفاوت في قابليتها للتأثر بالمضادات العديدة، فوجود سلسلة كبيرة من المواد للاختيار منها يحسن الفرص لإيجاد المضاد الحيوى المؤثر ضد ميكروب معين، والسبب الآخر، احتمال أن تصبح البكتيريا مقاومة لمضاد معين إذا ما تعرضت له فترة من الوقت، فوجود المضادات الحيوية المتنوعة يساعد على منع ظهور الأصناف المقاومة.

وعلى مر السنين، كانت المضادات الحيوية مصدرا كبيرا لربح الشركات الدوائية، ومن ثم قدمت برهاناً لا يقبل الشك في أن الكائنات المجهرية مصدر مفيد للمنتجات التجارية، وقدرت مبيعات المضادات الحيوية في الولايات المتحدة وحدها في عام ١٩٨٦، في مرات مختلفة بقيمة تتراوح ما بين واحد ونصف مليار دولارا إلى ثلاثة مليارات من الدولارات، وأخيراً، ساهمت المضادات الحيوية أيضاً في صناعة التخمر، لأن تصنيعها قد استخدم كأرضية ثابتة لتطوير وسائل التخمر الجديدة، وفى أساليب العزل والتقية أيضاً.

وتشمل الجزيئات الصغيرة الأخرى التى تنتجها التخمرات الميكروبية على الأحماض الأمينية والأحماض العضوية (شكل ٥-٤)، ومعظم العشرين حمضاً أمينياً أو نحو ذلك، الموجودة فى البروتينات يمكن أن تنتج بهذه الطريقة (جدول ٥-٥) ، وتستخدم الأحماض الأمينية كإضافات غذائية آمنة أو كعلائق للحيوان، وبالإضافة إلى ذلك، تستخدم كمواد وسيطة لتخليق منتجات تجارية، مثل الأسبرتام المحلى، الذى يستخدم على نطاق واسع فى إنتاج المشروبات الخفيفة الخالية من السكر، والمنتجات الأخرى ذات الأسعار المنخفضة، ويعتبر

الأسبرتام aspartame ببنتيد ثنائي يحتوى على مادة الفينيل الانين، وحمض الأسبرتيك.



شكل ١-٥ صورة مصغرة لظار عصيات الخلية *Acetobacter* ، يستخدم هذا المظهر في صنع عدة منتجات، من بينها ٢- ketogluconic acid

جدول ٥-٥ إنتاج الأحماض الأمينية بواسطة التخمر الميكروبي

Amino acids	Microorganisms
DL-Alanine	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Arginine	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Citrulline	<i>Bacillus subtilis</i>
L-Glutamic acid	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Histidine	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-Isoleucine	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Leucine	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
L-Lysine	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-Methionine	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Ornithine	<i>Microbacterium ammoniophilum</i>
L-Phenylalanine	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
L-Proline	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-Serine	<i>Corynebacterium hydrocarbonclastus</i>
L-Threonine	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-Tryptophan	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Tyrosine	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-Valine	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>

وتعتبر أحماض *arachidonic* و *eicosapentaenoic* من الأحماض الدهنية طويلة السلسلة ذات الأوزار الغذائية المهمة، ويعتبر حمض *arachidonic* الذي يحتوي على ٢٠ ذرة كربون وروابط مزدوجة من ٤ كربون-إلى-كربون أحد الأحماض الدهنية الأساسية التي لا يمكن أن تكونها الحيوانات الراقية، ولذلك يجب تناوله مع الوجبة الغذائية، ويعتبر نقطة البداية لتصنيع عدد من العوامل الفسيولوجية النشطة الأكثر فاعلية، التي تشمل *prostaglandins* (مركبات حمضية

من شبيهات الهرمونات القابلة للذوبان في الدهون (leukotrienes)، وتؤثر هذه المركبات على سلسلة كبيرة من الأنشطة الفسيولوجية؛ فالبعض منها يجعل صفائح الدم أقل التصاقاً، وقد تساعد نتيجة لذلك على منع تكون التجلط الشاذ، ويؤثر البعض الآخر على انقباض العضلات الرقيقة، وتشمل تلك العضلات الموجودة في الأوعية الدموية، أو التي تنظم وظيفة الكلى، ويعتبر التأثير على انقباض الوعاء الدموي ووظيفة الكلى من العناصر المهمة في تنظيم ضغط الدم، ولا يزال يشارك البعض الآخر من leukotrienes و prostaglandins في تفاعلات الحساسية والالتهاب، ولمعظم هذه المركبات تطبيقات طبية فعالة، إما كعقاقير، أو كأهداف للعقاقير.

ويعتبر حمض Eicosapentaenoic حمضاً دهنيّاً ذا "omega-3"، الذي يعنى أن له روابط مزدوجة بين الكربونات ٣ و ٤، وقد كانت له جاذبية كبيرة في الآونة الأخيرة، لاحتمال استخدامه كمانع للسكتات القلبية، بسبب تأثيراته الإيجابية على تركيزات كلوسترول الدم، وتوجد أحماض arachidonic و eicosapentaenoic بصورة طبيعية في زيوت بعض الأسماك، التي تشمل السلمون و التونا، وينتج الفطر *Porphyridium centrum* أيضاً الأحماض الدهنية، ويمكن أن يصبح مصدراً تجارياً مهماً.

ولبعض المركبات الأكثر جذباً التي تنتجها الكائنات المجهرية خصائص دوائية، يبدو أنها لا تؤثر على الكائن المنتج نفسه (جدول ٥-٦)، وتشمل هذه على مركبات تؤثر على الاستجابات المناعية (معدلات المناعة)، على سبيل المثال، والعوامل التي تخفف من الإحباط (مضادات الإحباط) وتخفف من ضغط

لنم(hypotensives)، أو لها تأثيرات مضادة للالتهابات، كل الأنشطة التي يبدو أنها غير مفيدة للميكروبات نفسها.

جنول ٥-٦ الإنتاج الميكروبيولوجي من المركبات النشطة دوائيا

Compounds	Pharmacological Activities	Microorganisms
Amastatin	Immunomodulator	<i>Streptomyces sp.</i>
Ascofuranone	Antilipidaemic	<i>Ascochyta viciae</i>
Bestatin	Immunomodulator	<i>Streptomyces</i> <i>Oliroreticuli</i>
١, r-Diphenethylurca	Anti-depressant	<i>Streptomyces sp.</i>
Dopastin	Hypotensive	<i>Pseudomonas sp.</i>
Esterastin	Immunomodulator	<i>Streptomyces lavendulae</i>
Forphenicine	Immunomodulator	<i>Streptomycesfulvoviridis</i>
Fusaric acid	Hypotensive	<i>Fusarium sp.</i>
Griseofulvin	Anti-inflammatory	<i>Streptomyces griseofulvum</i>
N-acetylmuramyl tripeptide	Immunomodulator	<i>Bacillus cereus</i>
Naematolin	Coronary Vasodilator	<i>Naematolomafasciculare</i>
Oosponal	Hypotensive	<i>Gloeophyllum striatum</i>
Oudenone	Hypotensive	<i>Oudemansiella radicata</i>
I Phialocin	Anticoagulant	<i>Phialocephala repens</i>
Slaframine	Salivation inducer	<i>Rhizoctonia leguminicola</i>
Zearalenone	Oestrogenic	<i>Gibberella zeae</i>

وقد لا يكون وجود هذه العوامل في الكائنات المجهرية أكثر من صفة بحتة، ولكنها على أية حال صفة سعيدة، وقد يكون نشاطها الدوائي في الحيوانات الراقية، غير مرتبط بوظائفها البيولوجية الحقيقية في الكائنات المنتجة لها، ومع

ذلك فقد تعكس الصدفية شمولية الطبيعة، وقد تتشابه الأشكال الجزيئية في مواقع تأثير العوامل في الثدييات والميكروبات ، على الرغم من أنه يرجح أن تكون النتائج للبيولوجية للتأثيرات مختلفة في مجموعتي الكائنات.

ومن غير المتوقع أيضاً لحد ما ،إنتاج الكائنات المجهرية لعدد كبير من المواد الكيميائية ذات النكهات أو الروائح المستحبة(جدول ٥-٧)، ويجرى فحص بعض من هذه المواد لتكون بدائل للعوامل المكلفة من مكسبات النكهة والرائحة في الأغذية والعطور.

وتشمل سلسلة المركبات الكبيرة المتنوعة التي تنتجها التخمرات الميكروبية على الأصباغ، والكوابح الإنزيمية، وخافضات التوتر، والهرمونات النباتية، ومبيدات الأعشاب، ومبيدات الحشرات(جدول ٥-٨)، والوظائف البيولوجية الطبيعية لبعض من هذه العوامل واضحة؛ فعلى سبيل المثال،تعمل خافضات التوتر surfactants على استحلاب الأغذية غير القابلة للذوبان في الماء وإلا فلن تجد الميكروبات التي تتغذى عليها وسيلة للتعامل معها، وتساعد خافضات التوتر أيضاً الكائنات العضوية المنتجة على أن تمتز وتفرز من الأسطح التي تنمو عليها، والدور الطبيعي للعوامل الأخرى من المنتجات الميكروبية المتنوعة،مثل الهرمونات النباتية ومبيدات الحشرات ليس واضحاً، مثل العوامل الدوائية التي ذكرناها من قبل.

جدول ٧-٥ الإنتاج الميكروبيولوجي من المواد الكيميائية المكسبة للطعم والرائحة

compounds	Aroma/flavour notes	Microorganisms
Anisaldehyde	Anise-like	<i>Trametes sauvolens</i>
Benzaldehyde	Almond-like	<i>Trametes sauvolens</i>
Benzyl alcohol	Fruity	<i>Phellinus igniarius</i> <i>Phellinus laevigatus</i> <i>Phellinus tremulus</i>
Cinnamic acid methyl ester	Fruity, lasmine	<i>Zuocybecorydalina</i>
Citronellol	Rose-like	<i>Ceratocystis variispora</i> <i>Trametes odorata</i>
Citronellyl acetate	Fruity, rose-like	<i>Ceratocystis variispora</i>
Gamma-decalactone	Peach	<i>Ceratocystis moniliformis</i> <i>Sporobolomyces odoratus</i>
Diacetyl	Buttery	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
1,2-Dihydro-2-phenyl-1,3-dioxane	Fruity	<i>Mycocacia uda</i>
Methylacetophenone		
p-Alpha-dimethyl	Grassy	<i>Mycocacia uda</i>
Phenyl alcohol		
Ethyl benzoate	Fruity	<i>Phellinus igniarius</i>
Ethyl butyrate	Fruity	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>
Geraniol	Rose-like	<i>Ceratocystis variispora</i>
Geranyl acetate	Rose, lavender	<i>Ceratocystis variispora</i>
Linakool	Floral	<i>Ceratocystis variispora</i> <i>Phellinus igniarius</i> <i>Phellinus tremulus</i>
Methyl amale	Amse-like	<i>Trametes sauvolens</i>
Methyl benzoate	Fruity	<i>Phellinus igniarius</i> <i>Phellinus laevigatus</i>
Methyl benzoate	Fruity	<i>Phellinus tremulus</i>
p-Methylacetophenone	Fruity, floral	<i>Mycocacia uda</i>
p-Methylbenzyl alcohol	Hyacinth, Gardenia	<i>Mycocacia uda</i>
Alpha,1-methyl-	Fruity	<i>Mycocacia uda</i>
Cyclohex-2-ene		
Ethyl alcohol		
Methyl-p-methoxy-phenylacetate	Anise-like	<i>Trametes odorata</i>
Methylphenylacetate	Honey-like	<i>Trametes odorata</i>
Methyl salicylate	Wintergreen	<i>Phellinus igniarius</i> <i>Phellinus laevigatus</i> <i>Phellinus tremulus</i>
Neral	Rose-like	<i>Ceratocystis variispora</i>
Nerol	Rose-like	<i>Trametes odorata</i>
Phenylethyl alcohol	Rose-like	<i>Phellinus igniarius</i> <i>Phellinus tremulus</i>
1-Pentyl-alpha-pyrone	Coconut-like	<i>Trichoderma viride</i>
Tetramethylpyrazines	Nutty	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
p-Tolualdehyde	Almond-like	<i>Mycocacia uda</i>

جدول ٨-٥ إنتاج مركبات متنوعة من التخمر الميكروبيولوجي

Compounds	Properties	Microorganisms
Antipain	Protease inhibitor	Various <i>Streptomyces</i>
Astaxanthin	Pigment	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Avermectin	Anthelmintic	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Carotenoids	Pigments	<i>Dunaliella bardawil</i> (alga) <i>Trentepohlia</i> (alga)
Chymostatin	Protease inhibitor	Various <i>Streptomyces</i>
Dopastin	Dopamine-beta Hydroxylase inhibitor	<i>Pseudomonas</i> sp.
Elastatinal	Elastase inhibitor	Various <i>Streptomyces</i>
Emulsan	Surfactant	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Fusaric acid	Dopamine-beta Hydroxylase inhibitor	<i>Fusarium</i> sp.
Gibberellins	Plant hormones	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Guanosine	Flavour enhancer Precursor	<i>Bacillus subtilis</i>
Herbicidin	Herbicide	<i>Streptomyces saganonensis</i>
Inosine	Flavour enhancer Precursor	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Ammonia</i> genes
Leupeptin	Protease inhibitor	Various <i>Streptomyces</i>
Oudenone	Tyrosine hydroxylase Inhibitor	<i>Oudemansiella radicata</i>
Pepstatin	Protease inhibitor	Various <i>Streptomyces</i>
Phosphatidyl	Surfactant	<i>Rhodococcus</i> sp.
Ethanolamine		
Piericidin	Insecticide	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
Polyketides	Pigments	<i>Monascus purpureus</i>
Polymyxin B	Surfactant, antibiotic	<i>Bacillus polymyxa</i>
Rhamnolipids	Surfactant	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sophorolipids	Surfactant	<i>Sorulopsis</i> sp.
Surfactin	Surfactant	<i>Bacillus subtilis</i>
Tetranactin	Miticide	<i>Streptomyces aureus</i>
Trehalose lipids	Surfactants	<i>Rhodococcus</i> <i>Erythropolis</i>
Vitamin B ₁₂	Vitamin	<i>Bacillus</i> sp. <i>Propionobacterium</i> <i>Shermanii</i> <i>Pseudomonas</i> sp.

وليس جميع المواد التي تنتجها الكائنات المجهرية مفيدة للإنسان، وأحد الأمثلة على المنتجات الضارة بالإنسان **aflatoxin**، وهى مادة مسرطنة شائعة، ينتجها فطر ينمو على الحبوب والبقول السوداني، وبالإضافة إلى ذلك فإن فطر الدابرة الأرجواني **Claviceps purpurea** الذى ينمو على الحبوب البقولية وبعض الحشائش، ينتج مجموعة من المركبات تعرف بأشباه القلويدات الأراجونية

وعندما يتناول الإنسان أو الحيوان هذه المركبات، فإنها تؤثر على الجهاز العصبى وتسبب اضطرابات عنيفة (رقصة القديس فينوس)، والغريزينا والوفاة، ويشتهق من حمض ليسرجيك، ديثيالايميد حمض ليسرجيك **diethylamide lysergic acid**، وهو عقار الهلوسة المعروف بـ **LSD**، وعلى الرغم من التأثيرات المشؤمة لأشباه القلويدات الأرجوانية، فإنها على الرغم من ذلك مفيدة، فعندما تستخدم بمقادير مناسبة، فإنها تتحكم فى تقلصات الرحم أثناء الولادة، وتتحكم فى النزيف **haemorrhage**.

وأياً كان تفسير وجود المواد الكيميائية الميكروبية العديدة، فسوف يتضح إن التخمرات هى المصدر الرئيس للمركبات غير المتوقعة التى قد تكون مفيدة للطب البشرى، وفى اليابان، جرى عمل اختبارات علمية على العديد من المواد النشطة دوائياً باعتبارها عقاقير دوائية ممكنة، وكنماذج لتوضيح الظواهر الدوائية، ومن المتوقع أيضاً أن تزيد تطبيقات المنتجات الميكروبية على سلسلة متنوعة من الاستخدامات الأخرى.

منتجات كيميائية من كائنات مجهرية مشلولة الحركة

Products of chemicals by immobilized microorganisms

ربما يكون لاستخدام الخلايا المشلولة الحركة فى التخليق الكيميائى الحيوى مزايا عديدة تفوق استخدام نظم التخمير ، فقد يمكن الحصول على كثافات أعلى بواسطة الخلايا المجمدة عما يحصل عليه من التخميرات التقليدية ، وقد تعطى نواتج أعلى من المنتج من حجم تفاعل معين ، وتعنى هذه الإنتاجية المرتفعة ، إنه سيكون هناك ثلوثاً أقل ناتج من كل وحدة منتج ، وعلاوة على ذلك ، تكون العملية المستمرة للتخمير أكثر سهولة .

وقد يكون للخلايا المشلولة الحركة أيضاً مميزات تفوق الإنزيمات المنقاة والمثبتة ، حيث يمكن أن يقلل استخدام الخلايا المشلولة الحركة تكلفة الإنزيم ، وسوف يقلل الحاجة إلى استخراج الإنزيم وتنقيته ، وقد تكون الإنزيمات الموجودة فى الخلايا أكثر ثباتاً أثناء العمليات المطلوبة لتخليق المنتج من الإنزيمات المنقاة التى تم تثبيتها .

بالإضافة إلى ذلك ، فالتخليق الأكثر تعقيداً قد يصبح سهلاً باستخدام الخلايا المشلولة الحركة خاصة عندما تستخدم الخلايا الحية ، وفى غالبية الأبحاث الأولى مع الخلايا المثبتة ، لم يكن مطلوباً سوى إنزيم واحد لتحويل الركائز إلى منتجات ، وتلائم الخلايا الميتة هذا الغرض طالما كانت تحتوى على إنزيم نشط ، إلا أنه فى الآونة الأخيرة ، اشتملت التحويلات الكيميائية العديد من المراحل الإنزيمية ، والتى كانت تقوم بها الخلايا الحية بصورة أفضل ، وتجديد العوامل المساعدة غير الإنزيمية ، التى قد تكون ضرورية لاستمرار عمل الإنزيم فى بعض تسلسلات التفاعل ، يمكن أن تقوم بها أيضاً الخلايا الحية .

يمكن تثبيت الخلايا بأية طريقة من طرق التجميد الست المختلفة ، وأشهر هذه الطرق ، هى اصطياد الخلايا فى مادة نسيج بيخلوية بوليمرية ، وقد يكون البوليمر

مخلفاً، مثل البولي أكريلاميد **polyacrylamide** أو بولي فينيل كلوريد **polyvinylchloride** أو بولي ارثين **polyurethane**، والتي ربما تكون معروفة بصورة أفضل في استخداماتها في اللدائن ومواد العزل، والبديل عن ذلك، يمكن أن يكون البوليمر من مصدر طبيعي، فالأجار **Agar** و **calcium alginate** و **K-carrageenan** تنتج جميعها من الطحالب، وهي من بين المواد الطبيعية التي يمكن استخدامها.

ويتضمن أسلوب ثانٍ لتثبيت الخلايا ربطها عرضياً بالكواشف الكيميائية، وفي إجراء ثالث، يمكن تثبيت الخلايا بربطها كيميائياً ببعض البوليمرات التخليقية أو نفس البوليمرات الطبيعية المستخدمة في اصطيات الخلايا أو بالمواد غير العضوية مثل الزجاج أو كرات الصلب الذي لا يصدأ أو الرمل أو أوكسيدات المعادن، وطريقة التثبيت الرابعة، هي امتصاص الخلايا لأنسجة التبادل الأيوني بين الخليوة مثل **diethylaminoethyl cellulose** أو **Sephadex** أو **carboxymethyl cellulose**، وتتضمن العملية الخامسة على تغليف الخلايا في كبسولات صغيرة في الأغشية الاصطناعية المعروفة بالليبوسومات، أو في الأنسجة المجوفة، والإجراء الأخير، هو تلييد الخلية **cell flocculation** عن طريق ربطها بالكائنات المجهرية بطريقة فيزيائية بدلاً من الطريقة الكيميائية.

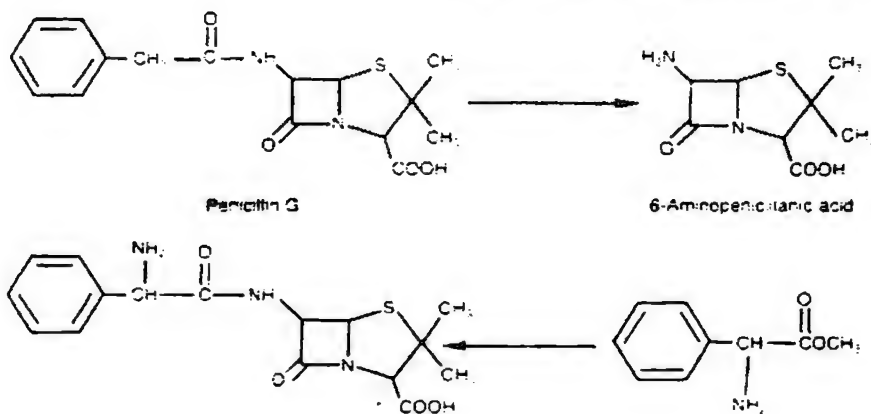
وعند اختيار نسيج بين خلوي **matrix**، يجب الأخذ في الاعتبار عدداً من العوامل، فيجب أن تكون المادة المثبتة ثابتة ومتوافقة مع الميكروب المستخدم ومع مواد ومنتجات التفاعل، ويجب ألا يمتص الإنزيم المحفز للتفاعل في المادة التي يثبت بها، ولا تنوب المادة التي تثبت في المنتج.

وتنتج الكائنات المجهرية المشلول حركتها العديد من أنواع المركبات نفسها، كالتى تخلق فى عمليات التخمر، ومع ذلك، فبالإضافة إلى المميزات التى نكرت عن تثبيت الكائنات العضوية، فغالباً ما تتيح أساليب التثبيت استغلال الميكروبات التى لا تستخدم عادة فى تفاعلات التخمر، وينطبق ذلك على تخليق الأحماض الأمينية والأحماض العضوية، على سبيل المثال.

وعلاوة على ذلك، فالكائنات المجهرية المشلولة الحركة، يمكن أن تجرى تفاعلات وتصنع منتجات لا يمكن الحصول عليها من طرق التخمر الأكثر تقليدية، وفى حين يتضمن إنتاج المضاد الحيوى من التخمرات عادة التخليق الكلى للمركبات، فإن الخلايا المشلولة الحركة تقوم بثلاثة أنواع مختلفة من العمليات، ويمكنها أيضاً أن تقوم بتخليق مضاد حيوى بالكامل، كما يحدث فى إنتاج مركبات مضاد الباسيل bacitracin والبنسيلين (penicillin G) والإستربتوميسين streptomycin وهى المضادات الحيوية المستخدمة على نطاق واسع، فى حين تصنع الخلايا المشلولة الحركة أيضاً precursors (أى مواداً تصنع منها مواد أخرى)، لاستخدامها فى تخليق عدد مختلف من المضادات الحيوية، وتحويل الـ precursors إلى منتجات نهائية، ومثال على ذلك، تحويل penicillin G الذى يتم الحصول عليه من تفاعل تخمري، فيتحول أولاً إلى مادة 6-aminopenicillanic acid وبعد ذلك فى وجود phenylglycine methyl ester يتحول للمنتج النهائى الإمبيسلين ampicillin (شكل ٥-٥).

وتحفز الخلايا المشلولة الحركة أيضاً بعض تعديلات الكربوهيدرات المهمة تجارياً، التى لن يكون معظمها مفيد فى طرق التخمر، حيث يجرى على المنتج المطلوب تفاعلات أخرى، ومن بين هذه التعديلات الكربوهيدراتية، إنتاج الشراب

عالي الفركتوز الذى يستخدم كثيراً كمادة مُحلِية (لها طعم السكر) فى المشروبات الخفيفة والمنتجات الأخرى المستمدة، إما من مادة سكر الجلوكوز البسيطة، أو من النشا النباتي **inulin** عديد السكريد . وأخيراً، تشمل المنتجات المتنوعة من الخلايا المشلولة الحركة مجموعة متنوعة من المواد، مثل العوامل المساعدة **cofactors** المستخدمة فى التفاعلات الإنزيمية، والـ **precursors** المستخدمة فى صنع اللدائن، والبوليمرات الأخرى والهرمون النباتى حمض الـ **gibberillic**، وعلى الرغم من أن بعض من هذه المواد بما فيها حمض الـ **gibberillic** يمكن تحضيرها بطرق التخمير، إلا أن الطرق المفضلة فى صناعتها، تستخدم تكنولوجيا الخلية المثبتة .



شكل ٥-٥ . تخليق الأمبيسلين ، الأمبيسلين G، الذى ينتجه فطر *Penicillium* يتحول إلى حمض ٦-aminopenicillanic بواسطة أى عدد من الكائنات المجهرية، يتحول بعد ذلك فى مرحلة ثالثة الحمض ٦-aminopenicillanic و ملح ميثيل فنوكس جليسين ميكروبيا إلى المضاد الحيوى الأمبيسلين المستخدم على نطاق واسع .

بيد أن لاستخدام الخلايا المشلولة الحركة عيوب محتملة، فكثر الإنزيمات فى الخلايا قد ينتج عنه تفاعلات ثانوية غير مرغوبة، ويمكن أن يحدث التلوث البكتيرى، وقد يكون النشاط الحفزى للإنزيمات الخلوية أقل من نشاط

الإنزيمات المنقاة المشلولة الحركة ، بالإضافة إلى ذلك ، فالنسيج البينخلوى غير القابل للذوبان، قد يعوق نقل المواد الداخلة والخارجة من الخلايا، ويمكن أن يؤدي ذلك إلى إعاقة التخلص من المنتجات ذات الوزن الجزيئى العالى، وبخول الأكسجين الذى تحتاجه الخلايا، ويمكن أن يكون له أيضاً تأثير سيئ على الأس الهيدروجينى للخلايا،إن لم يمكن سكب منتجات التفاعل الحمضية أو القاعدية للخارج.

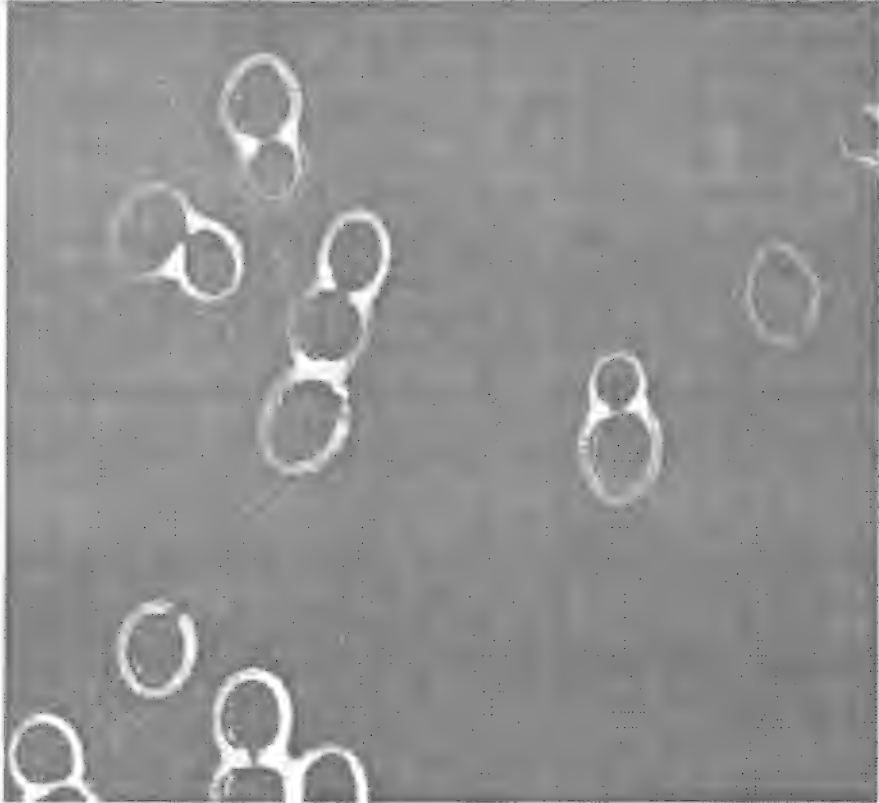
وهناك عدد من العوامل تحدد ما إذا كان من الأفضل استخدام طرق الخلية المشلولة الحركة أو الطرق التقليدية لصنع منتج معين، وتشمل هذه العوامل على تكاليف تربية وإعداد الخلايا المشلولة الحركة ، والنشاط الإنزيمى وثبات الخلايا، وإمكانية إعادة استخدام الخلايا والإنتاجية الكلية للنظام ،والاحتياجات من رأس المال المستثمر،وتكاليف تطهير التلوث والتحكم فيه، ويجب تحليل كل حالة على حدة،لأنه لا يوجد حل شامل للمشاكل الموجودة فى الإنتاج الميكروبي للمواد الكيميائية.

تخليق البروتينات الغريبة من كائنات مجهرية

Synthesis of foreign proteins by microorganisms

يمكن تخليق بروتينات غريبة عديدة حالياً بواسطة الكائنات المجهرية،التي تشمل البكتيريا والخميرة(شكل ٥-٦)،كنتيجة لتكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم(جدول ٥-٩ والفصل الرابع)، ولهذا التخليق عدد من المميزات، فالبروتينات التى كان يندر وجودها من قبل ، مثل هرمون النمو البشرى والإنترفيرونات،أصبحت متوفرة حالياً بكميات كبيرة من أجل الدراسة

والاستخدام العلاجي، ومع ذلك، فلا يزال هناك عدد من المشاكل في حاجة إلى حلول.



شكل ٦-٥ صورة مصغرة للفطر السكري (الخمائر أحادية الخلية) *Saccharomyces* استخدم هذا الفطر في صنع الخبز والبيرة، وفي تطبيق آخر، استخدم هذا الكائن العضوي كعائل مهندس وراثيًا لتصنيع البروتينات الغريبة، التي تشمل، الإنترليوكين-٢ البشري، وقد اختبر هذا البروتين إكلينيكيًا لعلاج السرطان والإيدز.

جدول ٩-٥ إنتاج البروتينات الغريبة من كائنات مجهرية

Proteins	Microorganisms
<i>Aspergillus</i> glucoamylase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacillus subtilis</i> cnao-beta-1, ٢,	<i>Escherichia coli</i>
-١, ٤-glucanase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacillus subtilis</i> penicilhinase	<i>Escherichia coli</i>
Bovine growth hormone	<i>Escherichia coli</i>
Calf prochymosin	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Cellulomonas fimi</i> cellulase	<i>Escherichia coli</i>
Beta-endorphin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Erwinia chrysanthemi</i> pectinases	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> beta-galactosidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Growth hormone releasing factor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hepatitis B surface antigen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Human epidermal growth factor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Human growth hormone	<i>Escherichia coli</i>
Human immunoglobulin E chain	<i>Escherichia coli</i>
Human alpha-interferon	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
Human beta-interferon	<i>Escherichia coli</i>
Human gamma-interferon	<i>Escherichia coli</i>
Human interleukin-٢	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Human proinsulin	<i>Bacillus subtilis</i>
Human tumour necrosis factor	<i>Escherichia coli</i>
Insulin-like growth factor I and II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mouse immunoglobulin E	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mouse interleukin-٢	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mouse interleukin-٢	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Rat protinsuhn	<i>Escherichia coli</i>
Semliki Forest virus protein E1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Sen-atia marcescens</i> nuclease	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> protein A	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> nuclease	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Streptococcus equisimilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Streptokinase	
<i>The t-momonospora</i> cellulase	<i>Escherichia coli</i>
Wheat alpha-amylase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

والعديد من البروتينات الغريبة التى تنتجها الكائنات المجهرية جزيئات هشة، وبالإضافة إلى ذلك، فقد تكون جزيئات الـ د.ن.أ. المطعمة غير ثابتة وراثياً، وغالباً ما تحتاج إلى معالجات وراثية لتصحيح التغيرات التى تطرأ عليها، ونتيجة لذلك، يجب اختبار وضمان سلامة البروتينات المنتجة بواسطة الميكروبات، خصوصاً إذا كان الغرض منها أن تستخدم فى علاج المرضى من البشر، والقوانين الحكومية، يستهدف العديد منها منتجات الـ د.ن.أ. المطعم، ويشكل عبئاً إضافياً على الشركات التى تصنع هذه المنتجات.

وستكون آخر أعاجيب التخليق الحيوى من الكائنات الحيوية المتغيرة وراثياً من الآن فصاعداً، ولا تقتصر التكنولوجيات الجديدة على إنتاج البروتينات التى أوجدتها الطبيعة، فالطرق الكيميائية والوراثية متاحة من أجل إنشاء أنواع جديدة من البروتينات على أمل تحسين دوائها، وقد تم هذا بالفعل بالنسبة لإنزيم الـ subtilisin، على سبيل المثال، وابتكرت دراسات هندسة البروتين فى مؤسسة جينيكس Genex Corporation فى روكفيل بولاية ميريلاند الثبات الحرارى للإنزيم، فى حين قام الباحثون فى Genencor فى جنوب سان فرانسيسكو بتخليق subtilisins طافرة، بمقاومة تبيض مرتفعة وكفاءة حفزية.

وفى تلك الأثناء، أثار إنتاج البروتينات البشرية من الكائنات المجهرية سؤالاً مهماً يتعلق بالتأثيرات التى يمكن أن تسببها مواد كهذه، مثل هرمون النمو البشرى أو الإنترفيرون أو الانترليوكين على فسيولوجيا الكائن العضوى المنتج، وقد ينتج عن دراسة هذه التأثيرات بعض من الفهم العميق لشمولية الكيمياء الحيوية للكائنات الحية، من جانب، واستراتيجيات التطور، من جانب آخر .

تحويلات الستيرويد بواسطة كائنات مجهرية Steroid transformations by microorganisms

تستخدم الكائنات المجهرية فى تعديل تركيبات مجموعة متنوعة من المواد، تشمل المضادات الحيوية، وأشباه القلويات، والهيدروكربونات الحلقية وال طولية، ومبيدات الآفات، والتربينات **terpenes**، والستيرويدات، والعديد من هذه التفاعلات سيكون صعب، إن لم يكن من المستحيل إنجازها بالطرق الكيميائية القياسية.

أحد الاستخدامات البارزة للإمكانات الحفزية المحددة للخلايا والإنزيمات المثبتة، هى فى تحويلات الستيرويد ذلك التطبيق الذى يختلف من حيث المفهوم عن معظم المفاهيم المذكورة من قبل، (فقد تعاملت الأمثلة السابقة إلى حد كبير مع تخليق المواد الكيميائية التى تصنعها عادة كائنات مجهرية، مع استثناء ملحوظ للبروتينات الغريبة التى تنتجها البكتيريا المهندسة وراثياً والميكروبات الأخرى) وتحويلات الستيرويد تعتبر أيضاً غريبة على الكائنات المجهرية، والتى على الرغم من ذلك لها إنزيمات، يمكن أن تستخدم الستيرويدات كركائز.

وجميع الستيرويدات لها نفس التركيب النمطى المتكون من حلقة ذات خمس ذرات كربون، وثلاث حلقات كل منها ذات ست ذرات كربون، والمركبات الستيرويدية موزعة على نطاق واسع فى الطبيعة، إذ توجد فى كل من النباتات والحيوانات.

ويعتبر الكلسترول أحد الستيرويدات الأكثر أهمية فى الحيوانات، وعلى الرغم من أن هذا المركب له سمعة سيئة بصفة عامة، ويرجع ذلك أساساً لأن

استهلاك كميات كبيرة من الغذاء كان مرتبطاً بالخطر المتزايد من حدوث النوبات القلبية، وهو رغباً عن ذلك ، عنصر أساسى فى أغذية الخلية، ويعتبر أيضاً نقطة البداية لتخليق هرمونات ستيرويد الجسم، وتشمل هذه الهرمونات على هرمون الجنس الذكرى المسمى بالتستوستيرون **testosterone**، وهرمونات الجنس الأنثوية الأوسترون **oestrogen** والبروجسترون **progesterone** ، وهرمونات القشرة الكظرية، المطلوبة من أجل تنظيم توازن الملح والماء، وأيض الجلوكوز، وملح الصفراء الرئيس **glycolate**، الذى يعتبر ضرورياً لامتصاص الدهون الغذائية من الأمعاء الدقيقة.

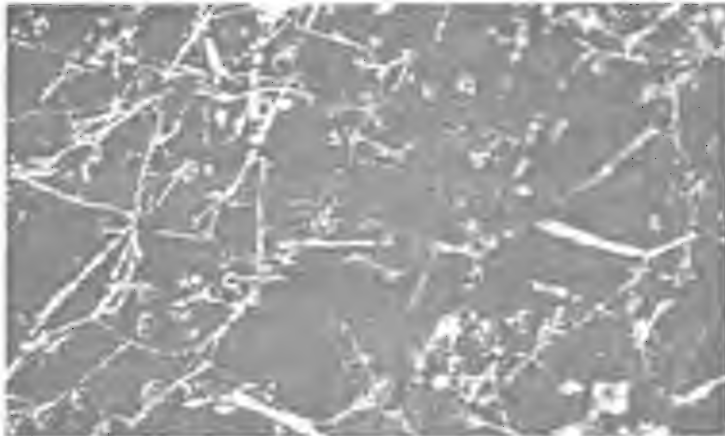
وقد ثبت فائدة العديد من الستيرويدات كعقاقير، فهى تستخدم لعلاج الأشخاص الذين يعانون من نقص فى الهرمون، بالإضافة إلى ذلك، فقد يعالج المرضى الذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية **autoimmune diseases**، أو الأشخاص الذين أجريت لهم زراعة أعضاء، قد يعالجون بالستيرويدات التى تبطل الاستجابات المناعية، وقد تستخدم العقاقير الستيرويدية أيضاً فى العلاج الكيميائى للسرطان. بيد أن الستيرويدات المستخدمة على نطاق واسع هى: الأوسترونات والبروجستيرونات التخليقية التى تعطى فى صورة حبوب لتنظيم النسل، ولم تصبح للعقاقير الستيرويدية هذا الانتشار الموجود حالياً، لولا تطوير طرق ميكروبية وكيميائية لتخليقها.

وغالباً ما تبدأ هذه التخليقات بالستيرويدات النباتية، التى تعتبر رخيصة نسبياً ويسهل الحصول عليها. ومع بداية الخمسينات، ظهرت طرق كيميائية لتحويل الستيرويدات النباتية إلى بروجيسترول، وهو وسيط فى تحويل الجسم للكلوسترول

إلى هرمونات ستيرويدية عديدة، وفى الطرق الكيميائية لإنتاج العقاقير الستيرويدية.

ويتطلب تخليق الستيرويد غالباً الإضافة المحددة من مجموعة هيدروكسيل لواحدة من الـ ١٧ ذرة كربون الموجودة فى الحلقة الستيرويدية للمركب الذى سيجرى التفاعل، وعلى سبيل المثال، فتحويل هرمون البروجسترون إلى الهرمون القشرانى السكرى glucocorticoids، الذى يحتوى على هرمونات القشرة الكظرية adrenal cortical hormones ومشتقاتها، يتطلب إضافة مجموعة هيدروكسيل من كربون-١١ من البروجسترون.

ويعتبر من الصعب جداً القيام بإضافة مجموعة الهيدروكسيل بوسائل كيميائية دقيقة وكاملة، غير أنه فى عام ١٩٥٠، أوضح كلاً من H.C Murray و D.H.Peter من شركة Upjohn فى كلامازو بولاية ميشيجان، أن الفطر *Rhizopus stolonifer* (شكل ٧-٥)، يمكن أن يقوم بدور الهيدروكسيلية بكفاءة تجارية عالية.



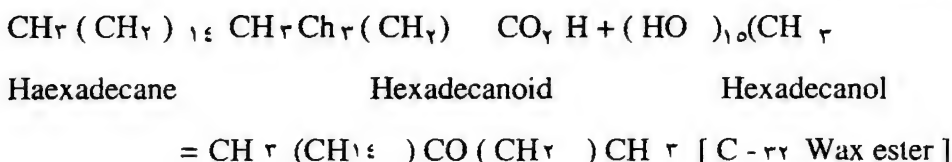
شكل ٧-٥ صورة مصغرة للفطر من النوع الممرض *R. stolonifer*، ويقوم هذا الفطر بتفاعل رئيس فى تخليق ستيرويدات علقلة glucocorticoid، التى قد تستخدم فى إخماد أجهزة المناعة للمرضى الذين أجروا زراعة أعضاء، ومن أجل علاج السرطان.

ومنذ ذلك الحين تم التعرف على الكائنات المجهرية التى يمكنها أن تضيف مجموعات الهيدروكسيل بصورة محددة لكل الكربونات الموجودة فى حلقة الستيرويد تقريباً، وقد حققت بعض من هذه التحولات منفعة صناعية، وتظل عملية الهيدروكسيلية الميكروبية للستيرويدات واحدة من أفضل الأمثلة لتفوق الحفز البيولوجى على الحفز الكيميائى، وبالإضافة إلى هيدروكسيلية حلقة الستيرويد، يمكن أن تؤثر الميكروبات على التحولات الأخرى للستيرويدات، التى تشمل على إزالة ذرات هيدروجين من ذرات كربونية معينة، وعلى سبيل المثال،فالتحول التجارى للـ **cortexolone** إلى **prednisolone** ، الذى يستخدم كعقار مضاد للالتهاب،يشمل أولاً على تفاعل هيدروكسيلي وبعد ذلك يزال الهيدروجين،وتقوم بإجراء تلك العمليتين الكائنات المجهرية.

تأثير تكوين الركيزة والبيئة علي تركيب المواد الكيميائية التي تنتجها
كائنات مجهرية

Effects of substrate composition and environment on the structure of chemicals produced by microorganisms

يمكن التوسع في القدرات التخليقية الطبيعية للكائنات المجهرية والتي تعتبر قدرات كبيرة بالفعل ، من خلال استخدام حالات تتحرف عن الحالات التي تواجه الميكروب عادة ، ويتم هذا أحيانا عن طريق تغيير مكونات الركيزة التي ينمو عليها الكائن المجهرى ، والمثال البارز على ذلك ، إنتاج استرات الشمع من بكتيريا *Acinetobacter sp. Ho ١ - N* . وتتكون استرات الشمع من أحماض دهنية طويلة السلسلة وكحوليات مرتبطة برابط من الإستر (ملح الكحول) ، وقد أوضحت الدراسات التي قام بها J. Geiger من شركة سيتوس فى إيمرفيل بولاية كاليفورنيا ، أنه عندما تنمو البكتيريا *Acinetobacter sp. Ho ١ - N* على ركيزة بسيطة من straight - chain hydrocarbon hexadecane ، التي توجد بها ١٦ ذرة كربون، فإن إسترات الشمع الرئيسية يحتوى كل منها على ٣٢ ذرة كربون ، وذلك لأن الكحوليات والأحماض التي ينتجها البكتير من الهكساديسين ، تحتوى جميعها على ١٦ ذرة كربون ، والإسترات المتكونة من ارتباط الكحوليات والأحماض ذات الـ ١٦ ذرة كربون ، فلا بد وأن تحتوى على ٣٢ ذرة كربون .



وبطريقة مشابهة، فعند تربية البكتير على أوكتاديسين، الذى له ١٨ ذرة كربون، سوف يؤدي إلى إنتاج استرات الشمع ذات الـ ٣٢ ذرة كربون، وإذا كانت الركيزة هي الأيكوسين eicosane المتكونة من سلسلة متصلة من الهيدروكربون ذى الـ ٢٠ ذرة كربون، فسوف تكون النتيجة خليط من الإسترات، على الأخص تلك الإسترات المحتوية على ٤٠ و ٣٨ و ٣٦ ذرة كربون، وهذا يحدث لأن الهيدروكربون المحتوى على ٢٠ ذرة كربون يتحول إلى بشائر استرية ذات ٢٠ و ١٨ ذرة كربون، وأخيراً، إذا استخدم هيدروكربون ذو الـ ٢٢ ذرة كربون، والمسمى بدوكوسان كركيزة للبكتير *Acinetobacter* sp. Ho-1-N، فسوف تحتوى إسترات الشمع الرئيسة على ٤٤ و ٤٢ و ٤٠ ذرة كربون.

ويهتم الباحثون بتغيير طول سلسلة استرات الشمع التى ينتجها البكتير *Acinetobacter*، حيث يعطى الكائن العضوى بدائل اقتصادية لاسترات الشمع الموجودة فى بعض الزيوت الطبيعية، بما فيها الاسترات التى تحمى جزئياً زيت عنبر الحوت، والأسماك البرتقالية الشرسة، ونبات jojoba، وهذه الزيوت التى لكل منها تكوين مختلف (جدول ٥-١٠)، تستخدم كشحوم، أما بالنسبة لزيت نبات jojoba فيستخدم فى مستحضرات الجميل، وأظهر البحث مع *Acinetobacter* إن اختيار الركيزة المناسبة، يمكن أن تساعد البكتير على إنتاج زيوت ذات تكوينات تشابه تكوينات الكائنات العضوية المعقدة (مثل زيت عنبر الحوت).

وهناك طريقة ثانية وأكثر براعة لتغيير طول السلسلة الكربونية لإسترات الشمع، هي من خلال تربية كائن عضوى على حمض البروبيونيك، الذى به ثلاث ذرات كربون، والمادة الرئيسة البادئة فى تخليق الأحماض الدهنية والكحوليات

ذات السلسلة الطويلة هي الحمض ذو الذرتين كربون، حمض الخليك **acetic acid**.

ولما كانت الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون أساساً من وحدات ذات ذرتين كربون، فإنها هي وأملاحها، لها أعداد زوجية من ذرات الكربونات، ولكن عندما يستخدم حمض البروبيونيك كركيزة لبكتير-**Acinetobacter sp. Ho¹**، فإن الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون من وحدات من ٣ ذرات كربون وأيضاً ذرتين كربون، وبالتالي تؤدي إلى إنتاج إسترات الشمع ذات الأعداد الفردية والزوجية من ذرات الكربون.

جدول (٥-١٠). توزيع إسترات الشمع الرئيسة من عدة مصادر بيولوجية

Source	No. of carbon atoms in wax esters									
	٢٨	٣٠	٣٢	٣٣	٣٤	٣٥	٣٦	٣٨	٤٠	٤٢
Orange roughy					+		+	M ^d	+	+
Spermwhale	+	+	M		+		+			
Jojoba bean								+	+	M
<i>Acinetobacter</i>	H ₁₀ -N									
N-Hexadecane			M							
N-Octadecane					+		M			
N-Eicosane							+	M	+	
N-Docosane									+	+
Acetic acid			+		M		+			
Ethanol			+		M		+			
Propionic acid			+	+	M	+	+			
Propanol			+	+	M	+	+			

^d"M, main ester.

والطريقة الثانية والأكثر دقة لتغيير طول سلسلة الإسترات الشمعية، تتم عن طريق تربية كائن عضوى على حمض البروبيونيك، الذى له ثلاث ذرات كربون، والمادة الرئيسة البادئة فى تخليق الأحماض الدهنية والكحوليات ذات السلسلة الطويلة هي الحمض ذو الذرتان كربون، حمض الخليك **acetic acid**. ولما كانت الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون أساساً من وحدات ذات

نرتين كربون ، فإنها هي وأملأها ، لها أعداد زوجية من ذرات الكربونات ، ولكن عندما يستخدم حمض البروبيونيك كمادة تفاعل مع البكتير *Acinetobacter sp Ho₁-N* فإن الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون من وحدات من ٣ ذرات كربون وأيضاً ذرتي كربون ، وبالتالي تؤدي إلى إنتاج إسترات الشمع بكل أعداد فردية وزوجية من ذرات الكربون .

ويمكن أن يغير أيضاً اختلاف درجة الحرارة التركيب الكيميائي لإسترات شمع الـ *Acinetobacter* ، وتوجد في الطبيعة علاقة مشتركة وعكسية بين درجة الحرارة وعدد الروابط الزوجية في الليبيدات ، مثل الأحماض الدهنية ، وعندما يحتفظ بكائن عضوى مثل *Acinetobacter* فى درجات حرارة عالية تكون الليبيدات التى ينتجها « مشبعة » إلى حد كبير والذى يعنى أنها لا تحتوى على روابط زوجية .

والأحماض الدهنية ذات السلاسل الطويلة ، تعتبر مركبات بارزة من ليبيدات أغشية الخلية ، وتتصهر الليبيدات غير المشبعة فى درجات حرارة أقل من الليبيدات المشبعة ، ونتيجة لذلك ، فالتغير فى تشبع الليبيد الذى يحدث عند تتغير درجة الحرارة ، يساعد على الاحتفاظ بسيولة الليبيد وعلى وظيفة الغشاء ، ويمكن أن يكون التغيير فى تكوين الليبيد تغيراً جوهرياً ، فمن خلال تقليل درجة الحرارة من ٣٠ درجة مئوية إلى ١٧ درجة مئوية ، ينتج عنه زيادة فى نسبة إسترات الشمع مع اثنان من الروابط المزدوجة ، التى تنتجها من ٩ إلى ٧٢ فى المائة ، فى حين تتناقص نسبة إسترات الشمع المشبعة من ٦٦ إلى ١٠ فى المائة .

(١) ومع ذلك عندما تنخفض درجة الحرارة تصبح الليبيدات غير مشبعة بشكل متزايد ؛ أى أن عدد الروابط الزوجية

يتزايد .

المستقبل

سيظل تحقيق الإمكانيات الكاملة من الإنتاج الميكروبي للمواد الكيميائية الحيوية مدخراً للمستقبل. وسوف تتطلب العديد من التفاعلات الميكروبية التي ذكرت في هذا الفصل تحسينات ، فقد ظهرت بشائرها التجارية، ولكن لا يزال هناك المزيد.

وسوف تمتد التحسينات المطلوبة لكل مرحلة من مراحل العمليات الميكروبية، ويجب أن تحدد ظروف أفضل لتربية الكائنات العضوية، يجب أن تكون طرق تثبيت سواء الميكروبات أو الإنزيمات التي تنتجها أكثر فاعلية ، وسوف تكون أيضاً مطلوبة الطرق الأكثر اقتصادية لإنتاج المواد الأولية الكيميائية من أجل التفاعلات.

وتصميم أجهزة التفاعل الحيوية، يعتبر هدفاً آخر من أهداف التحسين. فسوف يتيح هذا التصميم الجيد اتصالاً أفضل بين الحافز الحيوى المثبت والمواد الكيميائية الأولية، وسوف يساعد البحث عن ظروف أكثر تلاعماً للمفاعل الحيوى على زيادة غلات المنتج مثلما تساعد الطرق الأفضل في فصل المنتج عن المنتجات الثانوية والمخلفات، وعلى وجه الخصوص، تحتاج طرق عزل المنتجات من المحاليل المخففة إلى أن تتم بطريقة فعالة، وأخيراً، يجب أن تتم عملية إعادة تدوير الركائز غير المستخدمة والتخلص من المخلفات في عملية واحدة.

وسوف تصبح الكائنات المجهرية نفسها أهدافاً لأبحاث كثيرة، وسيشمل ذلك الجهود لتحسين الكائنات المجهرية المستخدمة حالياً، ويحتمل أن يتم ذلك عن

طريق الهندسة الوراثية بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، والتعرف على ميكروبات جديدة من أجل التطور التجارى، فالسلالات الميكروبية التى تنتج منتجاتها بكفاءة، ويمكن أيضاً أن تقاوم الضغوط البيئية مثل، ارتفاع درجات الحرارة وتركيزات الأملاح، والتغيرات فى الأس الهيدروجينى والتعرض للمذيبات، تعتبر من السلالات التى سيزداد الطلب عليها ، وبمجرد التعرف على مثل هذه السلالات من الكائنات المجهرية، فسوف تجد المشاكل الناجمة عن زيادة الحجم من المقادير المعملية إلى المقادير التجارية طريقها للحل.

وتتنوع هذه المشاكل تتنوع من عملية لأخرى، وغالباً ما يتطلب التغلب عليها قدراً كبيراً من الذكاء والبراعة.

وأخيراً ، فقد يقود البحث إلى استبدال التفاعلات الكيميائية بأخرى حيوية، وكان اليابانيون نشطين جداً فى هذا المضمار، فالإنتاج العلمى اليابانى يحتوى على العديد من التقارير التى تظهر جهداً علمياً نشطاً فى استخدام الطرق الميكروبية فى صنع سلسلة متنوعة من المركبات، التى تحتوى على الكحوليات والأحماض الدهنية والسكريات، التى تجرى حالياً بالطرق الكيميائية.

وقد أظهرت الكائنات المجهرية بالفعل نباشيرها فى هذا المجال، وسوف تكون إمكاناتها فى المستقبل هائلة، وسيقع على كاهل رجال التكنولوجيا الحيوية تحويل هذا الحلم إلى حقيقة.

الفصل السادس

بروتينات من كائنات وحيدة الخلية

Single-Cell Proteins

بروتينات الكائنات وحيدة الخلية، هي خلايا مجففة لكائنات مجهرية، مثل الطحالب والبكتيريا والخمائر والفطريات الصغيرة والفطريات الرقيقة، التي تربي في نظم استزراع ضخمة لاستخدامها كبروتينات للاستهلاك الأدمى أو الحيوانى، وتحتوى المنتجات مواد غذائية أخرى، تشمل المواد الكربوهيدراتية، والدهون، والفيتامينات، و المعادن.

ولا يعتبر استهلاك الكائنات المجهرية كجزء من الوجبة الغذائية البشرية حدثاً جديداً (جداول ٦-١ إلى ٦-٣)، فقد تناولها الناس في غذائهم بصورة أو بأخرى منذ عصور سحيقة، وعلى سبيل المثال، تعتبر خلايا الخميرة عنصر من عناصر اختمار الخبز، وتوجد بكتيريا حمض اللبن في الجبن والألبان المخمرة كالزبادى والمقانىق (السجق) المخمر، والفطريات هي العوامل المستخدمة في تحضير فول الصويا الشرقية المخمرة ومنتجات الأسماك، وزرع الأزتيك القدماء الذين عاشوا في المكسيك طحالب من جنس *Spirulina* في البرك القلوية، وتناولوها في وجباتهم الغذائية، ولا يزال يأكل سكان إقليم بحيرة تشاد في أفريقيا الـ *Spirulina* المجففة حتى في وقتنا الحاضر.

نشأت التكنولوجيا الحديثة لإنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية فى بريطانيا العظمى عام ١٨٧٩، مع استحداث القدور المزودة بالهواء لإنتاج خميرة الخبز الفطرية السكرية الجعوية (*Saccharomyces cerevisiae*)،

واستخدمت النابذة ٢ لأول مرة في الولايات المتحدة عام ١٩٠٠ تقريباً لفصل خلايا خميرة الخبز عن الوسط الذي تنمو فيه.

جدول ٦-١ التطورات التي طرأت على إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية منذ العصور القديمة حتى عام ١٩٠٠.

الفترة	الكائن العضوى	التطور التكنولوجى
عام ٢٥٠٠ قبل الميلاد	الفطيرة السكرية الجعوية	استخلاص خلاصة خميرة التخمر للخبز
١٧٨١-١٧٨٢	الفطيرة السكرية الجعوية	تخمير الخميرة المضغوطة من خميرة البيرة (المملكة المتحدة، هولندا، وألمانيا
١٨٦٠	الفطيرة السكرية الجعوية	عملية فيينا الدهناء، ركيزة الحبوب المجروشة المنقوعة (النمسا)
١٨٦٨	الفطيرة السكرية الجعوية	إخخال تصنيع الخميرة المضغوطة في الولايات المتحدة (فيلشمان)
١٨٧٩	الفطيرة السكرية الجعوية	التهوية المستمرة (المملكة المتحدة)
١٩٠٠	الفطيرة للسكرية الجعوية	استخدام النابذ لفصل الخميرة (الولايات المتحدة)

جدول ٦-٢ التطورات التي طرأت على إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية في الفترة من عام ١٩٠٠ - ١٩٤٥.

الفترة	الكائن العضوى	التطور التكنولوجى
١٩١٤-١٩١٨	الفطيرة السكرية الجعوية	تغذية متزايدة، مولاس، أملاح أمونيوم (ألمانيا)
١٩١٨-١٩١٩	Endomyces (سل) vernalis	إنتاج الدهون من سائل الكبريتيت (ألمانيا)
١٩٢٠	الرشاشيات الدخناء	النمو على القش والنتروجين غير العضوى لتخمير علف الماشية (ألمانيا)
١٩٣٦	الفطيرة السكرية الجعوية	عملية هلمسكى القديمة لاستخدام سائل الكبريتيت (فنلندا، ألمانيا)
١٩٣٦	الفطيرة السكرية الجعوية	عملية سكولر-تورنسك لإنتاج خميرة علف الماشية من سكر الخشب (ألمانيا)
١٩٤١-١٩٤٥	Candida utilis (فطر)	إنتاج خميرة الطعام من سائل الكبريتيت وسكر الخشب (ألمانيا)
	Geotrichum candidum (فطر)	إنتاج الدهون (ألمانيا)

جدول ٦-٣ التطورات التي طرأت على إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية منذ عام ١٩٤٥ وحتى وقتنا الحاضر.

الفترة	الكائن العضوى	التطور التكنولوجى
١٩٤٥-١٩٥٤	<i>Candida utilis</i>	تشغيل مستمر للخميرة من سائل الكبريتيت-مخمرات ووالدهوف(الولايات المتحدة)
١٩٤٨-١٩٥٣	<i>Chlorella</i> sP.	إنتاج الطحالب بنظم الدورات المفتوحة(اليابان)
١٩٥٩	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	الإنتاج المستمر من خميرة الخبز على المستوى التجارى(انجلترا)
١٩٥٤-١٩٦٣	<i>Morchella</i> sP.	المزارع المغورة من فطر عيش الغراب(الولايات المتحدة)
١٩٥٨-١٩٦٤	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	إنتاج خميرة فارجليس للطعام من شرش الجبن(الولايات المتحدة)
١٩٥٧-١٩٧٢	<i>C.lipolytica, C.tro-picalis</i>	إنتاج الخميرة من الهيدروكربونات،-n-paraffins، زيوت الغاز فى مخمرات الهواء المساعد(المملكة المتحدة وفرنسا واليابان وروسيا)
١٩٦٣-١٩٧٤	Fungi	إنتاج الفطريات من سائل للكبريتيت المستهلك، عملية بكميو(فنلندا)
١٩٧٠-١٩٧٤	<i>C.utilis</i>	إنتاج خميرة الطعام من الإيثانول(الولايات المتحدة)
١٩٧١-١٩٧٥	<i>K. fragilis</i>	الإنتاج المستمر من خميرة فارجليس والإيثانول لومن الإيثانول من شرش الجبن
١٩٧٩-١٩٨٠	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	الإنتاج البكتيرى المستمر للبروتين من كائنات وحيدة الخلية من الميثانول على نطاق تجارى(المملكة المتحدة)
١٩٨٣-١٩٨٥	<i>C.utilis, K.fragilis, S.cerevisiae</i>	كثافة خلوية عالية، عملية تجفيف مبشر لإنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية من الإيثانول والكربوهيدرات(الولايات المتحدة)

كانت خميرة الخبز تنتج فى ألمانيا خلال الحرب العالمية الأولى للاستهلاك الأسمى فى صورة إضافة بروتينية، واستخدم المولاس كمصدر للكربون والطاقة لاستزراع الخميرة، واستخدمت أملاح الأمونيوم كمصدر للنيتروجين، ثم استزرعت ألمانيا خلال الحرب العالمية الثانية خميرة من جنس الفطور الخمرية *Candida utilis* كمصدر بروتينى للاستهلاك الأسمى والحيوانى، وكانت المادة التى ينمو عليها هذا الفطر هى مخلفات سائل الكبريتيت الناتج عن تصنيع الورق واللباب وسكر الخشب، الذى كان يتم الحصول عليه من الانحلال الحمضى للخشب.

وفى السنوات الأخيرة، أدت التطورات التى حدثت فى المعرفة العلمية بفسولوجيا وتغذية ووراثة الكائنات المجهرية إلى تحسينات مهمة فى إنتاج البروتين من سلسلة كبيرة من الكائنات وحيدة الخلية والمواد التى تنمو عليها، وعلى سبيل المثال، يمكن إنتاج البكتيريا التى تحتوى على نسبة من البروتين- ٧٢% أو أكثر - بصورة مستمرة من الميثانول كمادة خام، ويمكن أن تنمو خمائر تستخدم كغذاء بتركيزات خلوية عالية لتقليل تكاليف الطاقة المستخدمة فى تجفيف الخلايا.

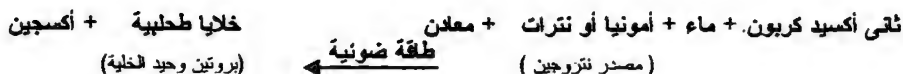
واستخدمت كل من الكائنات المجهرية التى تستمد أولاً تستمد طاقتها من التمثيل الضوئى فى إنتاج بروتين الكائنات وحيد الخلية، وتتطلب هذه الكائنات، كحد أدنى بيئة مائية لكى تنمو، ومصدر كربون وطاقة ومصدر نيتروجين وتوفر عناصر غذائية أخرى، تشمل الفسفور والكبريت والحديد والكالسيوم والمغنسيوم والمنجنيز والصوديوم والبوتاسيوم والعناصر الصغرى، ولا تستطيع بعض الكائنات العضوية أن تصنع الأحماض العضوية والفيتامينات والمكونات الخلوية الأخرى من مصادر كربونية ونيروجينية بسيطة، وفى هذه الحالة، يجب أن توفر هذه المواد للكائن العضوى لكى ينمو عليها .

استخدام الكائنات العضوية المخلقة ضوئياً لإنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية .

Photosynthetic organisms in single-cell protein production

تعتبر الطحالب والبكتيريا من بين الكائنات المجهرية المخلقة ضوئياً، التى تستغل فى إنتاج البروتين من وحيدات الخلية. فالنمو المخلق ضوئياً للطحالب

المفيدة، التي تشمل أنواع *Chlorella* و *Scenedesmus* و *Spirulina* (جدول ٤-٦) يمكن تمثيلها كما يلي:



يصل تركيز ثاني أكسيد الكربون الموجود بالجو حوالي ٠,٠٣%، والذي لا يعتبر كافياً كي يساعد على نمو الطحالب بالمعدلات المطلوبة لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية، ويمكن إضافة مقادير من ثاني أكسيد الكربون بواسطة الكربونات أو البيكربونات الموجودة في البرك القلوية عن طريق الغازات الناتجة أثناء الاحتراق أو من تحلل المادة العضوية في مخلفات الصرف الصحي والصناعي، وعلى سبيل المثال، يتراوح تركيز ثاني أكسيد الكربون في غازات الاحتراق ما بين ٠,٥% إلى ٥%.

جدول ٤-٦: عمليات مختارة لتصنيع البروتين من طحالب وحيدة الخلية.

الجهة المنتجة أو المطورة	الإنتاج	المادة الخام	الكائن العضوى
الشركة التايوانية لتصنيع الكلوريللا المحدودة ، تايبيه ، تايوان.	٢ طن متري/يوم	ثاني أكسيد الكربون (من التخليق الضوئي) شراب القصب، المولاس (من التخليق غير الضوئي)	<i>Chlorella</i> sP.
معهد الأبحاث التكنولوجى المركزى للأغذية بيسور، الهند	٢٠ جم/٢ يوم	ثاني أكسيد كربون جوي (التخليق الضوئي)	<i>Scenedesmus</i> <i>Acutus</i>
سوسا تكمكوسا مكسيكو سيتى.	٣٢٠ طن متري/سنة	٢ ك ٣١	<i>Spirulina</i> <i>maxima</i>

وتشمل مصادر النيتروجين لإنتاج الطحالب أملاح الأمونيا أو النترات أو النيتروجين العضوى الموجود في برك أكسدة الصرف الصحي، وعادة ما توجد

المواد الغذائية الفسفورية والمعدنية الأخرى فى المياه الطبيعية ومياه الصرف الصحى بتركيزات كافية لنمو الطحالب، وتعتبر مشكلة "الإزهار" الطحلي algal bloom التى تحدث فى أواسط فصل الصيف فى العديد من الخزانات، دليلاً واضحاً على كفاية تركيزات هذه المواد الغذائية.

شدة الضوء ودرجة الحرارة من العوامل المهمة لنمو الطحالب. فاستخدام الضوء الصناعى يعتبر مكلفاً جداً لإنتاج البروتينات من وحيدة الخلية كمادة غذائية للحيوان، ولكى يكون استزراع مقادير كبيرة من الكائنات المجهرية مجدى اقتصادياً حينئذ، يجب أن تكون السماوات صافية نسبياً فى مواقع الاستزراع، كما يجب أن تكون هناك التغيرات فى شدة الضوء طفيفة خلال العام، بالإضافة إلى ذلك، يجب ألا تقل درجة الحرارة عن ٢٠ °مئوية فى معظم أيام السنة، وبناء على ذلك، تعتبر البرك الصناعية فى المناطق المدارية وشبه المدارية أو الجافة من المناطق النموذجية لتربية الطحالب، وتشمل المواد المستخدمة فى بناء البرك الصناعية: الخرسانة واللدائن أو رقائق الألياف الزجاجية.

ويتطلب استزراع الطحالب برك ذات مساحات كبيرة، وتنمو الطحالب فوق الـ ٢٠ أو الـ ٣٠ سم العليا من سطح البركة، حيث تكون شدة الضوء عالية، وغالباً ما تقلب مياه البرك، إما بصورة مستمرة أو بصورة متقطعة بواسطة الطلمبات أو العجلات المجدافية أو الطواحين الهوائية، لمنع الطحالب من الرسوب فى قاع البركة، ويضمن هذا التقليب تعرض الخلايا والمادة الغذائية للضوء بانتظام.

تربى الطحالب بصفة عامة فى ظروف استزراع مختلطة غير معقمة، فى أماكن تفضل فيها الظروف البيئية تسيد الأنواع الطحلبية المرغوبة على الأنواع المنافسة، وفى المكسيك، أنتج الطحلب الأزرق-الأخضر من نوع *Spirulina maxima* كمرحلة تجريبية فى المياه القلوية الطبيعية لبحيرة تكسكوكو، والتي يتراوح فيها الأس الهيدروجينى ما بين ٩ إلى ١٠، وتطفو خلايا السبريولينا *Spirulina* على السطح فى صورة كتل طحلبية ويجرى جمعها. وأنتجت وحدة تجريبية فى هذا الموقع طناً واحداً فى اليوم من البروتين من الطحالب وحيدة الخلية وطرح للبيع كغذاء صحى.

ويجرى تربية السبريولينا أيضاً بكميات تجارية صغيرة فى جزر هاواى وتايلاند وإسرائيل وتايوان، وفى هاواى تستخدم شركة كيانوتيك *Cynotech* بركتين لإنتاج ما يقرب من ٦٢٥ كجم من المنتج الجاف شهرياً لبيعه فى متاجر الأغذية الصحية بسعر ١٨ دولاراً للكيلوجرام الواحد. وبيع منتج بهذا السعر هو بالقطع من أجل المستهلكين المترفين ولا يعتبر منتجاً شعبياً لإطعام ملايين المواطنين فى البلدان الفقيرة. وفى اليابان وتايوان، يجرى زراعة نوع من طحالب كولوريللا *Chlorella* بطريقتين، إما بالتخليق الضوئى فى البرك الصناعية المكشوفة، أو فى خزانات داخلية، ويستخدم شراب السكر أو المولاس كمصادر للكربون، وتباع الطحالب المجففة والطحالب المنتجة فى هذه البلدان فى صورة أقراص كأغذية صحية.

وتتعاون الحكومتان الهندية والألمانية فى مشروع الطحالب الهندى-الألمانى، وقد أنشئ برنامج تعاونى فى المعهد التكنولوجى المركزى للأغذية فى مدينة مايسور بالهند لاستزراع الطحالب من جنس *Scenedesmus* فى

برك اصطناعية، وقد أقام هذا البرنامج مشروعات فى كل من مصر والهند وبيرو وتايلاند، بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسات التى أجريت فى إسرائيل والأرجنتين، أن الطحالب المقاومة للأملاح من جنس *Dunaliella* يمكن زراعتها فى المياه الملحية لإنتاج بروتين من كائنات وحيدة الخلية، وإنتاج الجليسرول والبيتا-كاروتين كمنتجات مساوية لها فى الأهمية.

ويخدم زراعة الطحالب على مخلفات الصرف الصحى هدف مزدوج، فهى تنظف البيئة من التلوث المحتمل وفى نفس الوقت تنتج بروتينات غذائية، وعلى سبيل المثال، أجرى الباحثون فى معهد التكنولوجيا فى حيفا بإسرائيل دراسات مكثفة فى هذه المدينة على معالجة الصرف الصحى فى برك طحلبية وفى نفس الوقت إنتاج بروتين من خلايا وحيدة الخلية للعلف الحيوانى، وقد اتضح أن مدينة حيفا موقع مناسب لزراعة الطحالب لوجود شدة استضاءة عالية من الشمس على مدار العام.

وتتكون البرك هناك من قنوات ضحلة ملتوية مزودة بأجهزة لمزج وتهوية الطحالب، وتنمو المزرعة المختلطة من البكتيريا والطحالب فى البرك على أنواع كثيرة من طحالب *Chlorella* و *Euglena* و *Micractinium* و *Scenedesmus*. ويعتبر هذا نظاماً تكافلياً، حيث توفر الطحالب الأكسجين الذى تحتاج إليه البكتيريا.

وتشمل المزارع المكشوفة للطحالب لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية على إقران تكنولوجيا زراعية بميكروبيولوجيا صناعية، ويعتمد هذان النظامان ويتقيدان بالمناخ وتتوفر الماء والضوء وثانى أكسيد الكربون والمواد الغذائية، ويمكن أن يعمل بطريقة مثالية من خلال التحكم فى مورد ثانى أكسيد الكربون وانسياب السائل وتهوية النظام، وتصل إنتاجية النظام إلى مقدار يصل إلى

٣٥ طناً مترياً من البروتين الطحلبى الجاف لكل هكتار (الهكتار = ١٠٠٠٠ متر مربع) من سطح البركة فى العام.

ولما كانت تركيزات الخلية الطحلبية فى سوائل المزرعة تتراوح ما بين جرام واحد إلى جرامين فقط من المادة الجافة لكل لتر، فيجب أن تعالج كميات المياه الكبيرة فى عمليات جمع الإنتاج، ويساعد ذلك بدرجة كبيرة على خفض تكاليف البروتينات من الطحالب وحيدة الخلية، ويجب أن تركز الخلايا بأية طريقة من الطرق المختلفة، التى تشمل: التعويم والترشيح والنبذ والتليد، ثم يتلوها عملية ترسيب، ثم تجفف المادة بعد ذلك فى مجففات أسطوانية، وعلى الرغم من أن التجفيف الحرارى فى المجففات الأسطوانية مكلفاً، فتعتبر هذه المعالجة الحرارية ضرورية للقضاء على الكائنات المجهرية التى يحتمل أن تسبب أمراض، وقد تلوث الطحالب التى تزرع فى برك معالجة الصرف الصحى.

وتشمل بكتيريا التخليق الضوئى المستخدمة لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية بكتيريا من جنس Rhodo-pseudomonas التى تم استزاعها على مخلفات الصرف الصحى والصناعى فى اليابان، لاستخدامها كعلية حيوانية، وتتمو هذه البكتيريا فى المزارع المختلطة على البكتيريا المثبتة للنتروجين والأنواع الأخرى الهوائية، ويجب أن يتوفر لها مواد عضوية، مثل مصادر الكربون والطاقة، ولا تنمو على ثانى أكسيد الكربون والضوء مثل الطحالب، وتبلغ كثافة المزرعة فى حدود جرام لجرامين من المادة الجافة لكل لتر، وفى هذا النظام أيضاً، توجد نفس المشاكل القائمة بالنسبة للطحالب مثل عمليات الفصل والتركيز .

الإنتاج غير المخلق ضوئياً من البروتين من وحيدات الخلية

The non-photosynthetic production of single-cell protein

تشمل الكائنات المجهرية غير المخلقة ضوئياً التي تربي من أجل الحصول على البروتينات من وحيدات الخلية البكتيريا وعفن الخبز والخمائر والفطور الأخرى، وهذه الكائنات العضوية كائنات هوائية، ويجب أن يتوفر لها الأكسجين حتى تنمو، وتتطلب أيضاً مصدراً من الكربون والطاقة، بالإضافة إلى مصادر من عناصر النتروجين والفسفور والكبريت والمعادن، التي ذكرت من قبل كمصادر أساسية لنمو الطحالب.

ويمكن أن يمثل تحويل للمركبات العضوية إلى بروتين من الكائنات المجهرية وحيدات الخلية غير المخلقة ضوئياً تبعاً للمعاملة التالية :

كربون عضوى + نتروجين + مادة غذائية معدنية + أكسجين ←
بروتين من وحيدات الخلية + ثانى أكسيد الكربون + ماء + حرارة

البكتيريا

The bacteria

اختبرت عدة أنواع من البكتيريا لاستخدامها فى إنتاج البروتين من وحيدات الخلية، وبعد النمو السريع من بين الخصائص التي تجعل البكتيريا ملائمة لهذا التطبيق. وتتكاثر هذه البكتيريا خلال فترات قصيرة، فيمكن لمعظمها أن يضاعف كتلته الخلوية فى مدة تتراوح ما بين عشرين دقيقة إلى ساعتين، والفترة المقارنة للخمائر فى حدود ثلاث ساعات، وبالنسبة لعفن الخبز والفطور يتراوح زمن التكاثر من أربع إلى ست عشرة ساعة .

ويمكن أن تنمو البكتيريا أيضاً على عدة أنواع مختلفة من المواد الخام التى تتراوح ما بين مواد كربوهيدراتية، مثل النشا والسكريات، إلى هيدروكربونات غازية وسائلية، مثل أجزاء الميثان والبتروول، إلى بتروكيماويات، مثل الميثانول والإيثانول، وتشمل مصادر النتروجين المناسبة على الأمونيا وأملاح الأمنيوم واليوريا والنترات والنتروجين العضوى الموجود فى المخلفات، ويجب إضافة مادة غذائية معدنية إلى وسط المزرعة البكتيرية لكى تعطى المواد الغذائية التى قد تكون غير موجودة فى المياه الطبيعية تركيزات كافية لكى تساعد على النمو. ويتحسن نمو الأنواع البكتيرية المحتمل استخدامها لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية فى أس هيدرجينى منخفض الحمضية إلى متعادل، ويتراوح ما بين ٥ إلى ٧ ، ويجب أن تستطيع البكتيريا أيضاً تحمل درجات الحرارة تتراوح ما بين ٣٥ ° إلى ٤٥ ° مئوية، حيث تتبعث الحرارة أثناء النمو البكتيرى، واستخدام السلالات البكتيرية التى تتحمل درجات الحرارة، يقلل من الحاجة إلى تبريد المياه التى تبرد وعاء التخمر، ولا يمكن استخدام الأنواع البكتيرية لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية، إذا كانت تضر بالنبات والحيوانات أو البشر.

وقد يمكن إنتاج البروتين من وحيدات الخلية بواسطة نظم العبوة التقليدية، التى تضاف فيها المواد الغذائية أولاً إلى جهاز التخمر ويجرى حصاد الخلايا عندما تستهلك المواد الغذائية ويتوقف النمو، إلا أنه فى طرق الإنتاج المتطورة، يجرى إضافة المواد الغذائية بصورة مستمرة بالتركيزات المطلوبة للمساعدة على النمو البكتيرى، وتحصد الخلايا بصورة مستمرة بمجرد وصول كتلة الخلايا إلى التركيز المطلوب.

ويتراوح تركيز مصدر الطاقة والكربون ما بين ٢% إلى ١٠% فى كل مرة من عمليات العبوة، وبالنسبة لنظام العبوة المستمر، يجرى تنظيم إمداد مصدر الكربون، بحيث لا يزيد تركيزه فى وسط النمو عن التركيز الذى يتطلبه نمو الخلايا البكتيرية.

هذا التركيز سيكون عموماً أقل من التركيزات المستخدمة فى عمليات العبوة، ومن الأمور المهمة جداً، الحفاظ على ظروف التعقيم أثناء إنتاج البروتين من وحيدات الخلية، حيث تنمو الكائنات المجهرية الملوثة بشكل جيد فى وسط المزرعة، ويجب تعقيم الهواء المستخدم والوسط الغذائى وجهاز التخمير المستخدم فى كل عمليات إنتاج البروتين من الخلايا البكتيرية، وأن يحافظ على ظروف التعقيم خلال دورة الإنتاج.

ويظهر نظام الإنتاج المستمر للبروتين من البكتيريا بواسطة الميثانول كمصدر للكربون والطاقة سمات مشتركة مع معظم طرق الإنتاج (شكل ٦-١)، وبعد تعقيم المواد الغذائية يجرى إدخالها إلى وعاء التخمير وتلقم بالبكتيريا التى ستتمو عليها. ويجب أن يزود الوعاء المعروف بالمفاعل الحيوي bioreactor بالهواء المعقم وبالماء المبرد لمنع تكون الحرارة المنبعثة أثناء التخمير وموت الخلايا، ويجرى تدوير الماء البارد، إما بواسطة قميص يحيط بجهاز التخمير من الخارج، أو بواسطة ملفات تبريد داخلية.

وتزود أوعية التخمير أيضاً بأجهزة لقياس وضبط الأس الهيدروجينى ودرجة حرارة المكونات وتركيز الأكسجين المذاب، ويحتوى الهواء المطرود من المفاعل الحيوى على غاز ثانى أكسيد الكربون، الذى يفصل ويضغط لى يباع للمعامل الصناعية التى تستخدم الغاز.

وبعد إزالة البكتيريا من خزان التخمر يجب فصلها من حساء المزرعة، والذي يتم عادة بإضافة المواد الكيميائية التي تعمل على تجميع الخلايا ثم نبذها بالطرد المركزي، وتجفف الخلايا التي تم فصلها لتعطى منتجاً سيكون ثابتاً أثناء الشحن والتخزين، وأخيراً يجب أن يوجد جهاز لطحن وتعبئة الخلايا، ونظام لمعالجة وتدوير سائل المزرعة المستهلك.

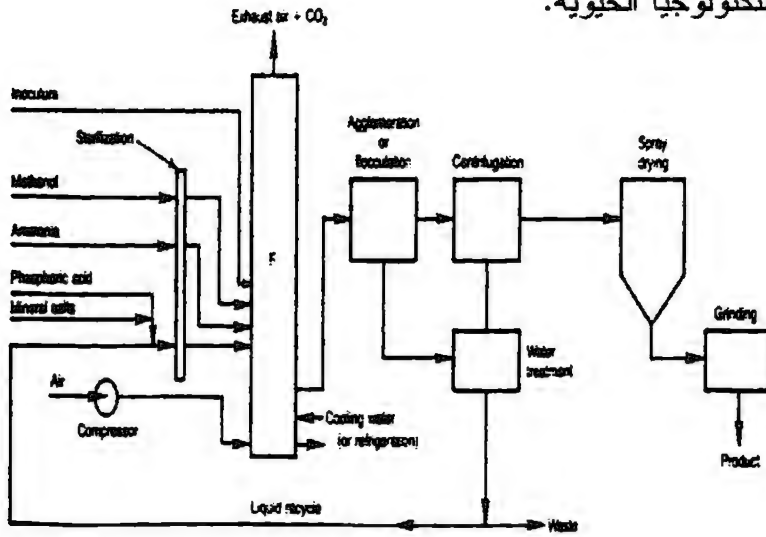
ويعتبر نقل الأكسجين إلى جهاز التخمر من العوامل المهمة جداً في الحصول على معدلات نمو وإنتاج مجدية اقتصادياً، ويمكن أن توفر تصميمات جهاز التخمر المختلفة التهوية الملائمة، ومن أكثر المفاعلات استخداماً هو baffled stirred-tank reactor (الخزان المزود بمصدات لتقليب مكوناته) (شكل ٦-٢) وجهاز التخمر air-lift fermentor (شكل ٦-٣).

وعلى الرغم من أنه أجريت أبحاث مهمة على إنتاج البروتين من البكتيريا وحيدة الخلية خلال فترة الستينات وأوائل السبعينات، فقد طورت الصناعات الكيميائية الإمبريالية (ICI) في المملكة المتحدة العملية الفريدة للوصول إلى مستوى تجارى من العمليات، فقد استخدمت (ICI) فى عملياتها البكتير *Methylophilus methylotrophus*، الذى له دورة تكاثر حوالى ساعتين، وينمو بصورة مستمرة على الميثانول كركيزة وعلى مواد غذائية إضافية، تحتوى على الأمونيا والمعادن والفسفور والكالسيوم واليوتاسيوم، وابتكرت الشركة للعملية جهاز تخمر air-lift فريد ذا سعة ١٥٠٠ متراً مكعباً، ويقلل تصميم جهاز التخمر من متطلبات تبريد وعاء التخمر ومن مشكلة قيود الأكسجين.

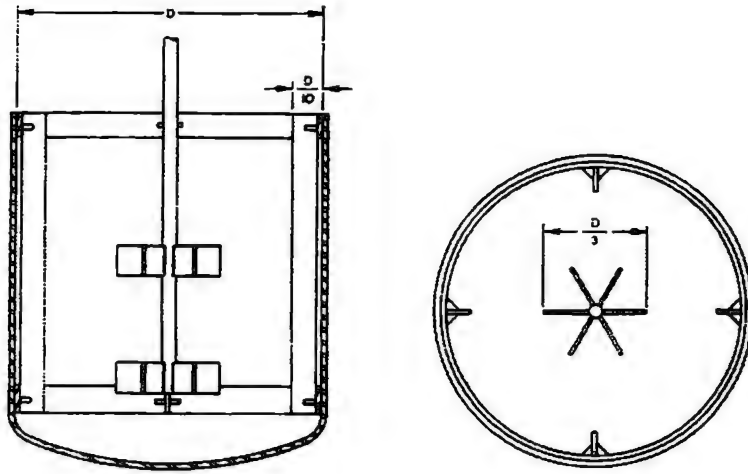
وأنشأت (ICI) فى عام ١٩٨٠ مصنعاً ذا سعة إنتاجية بلغت ٥٠٠٠٠ طن متري من البروتين الناتج من الكائنات وحيدة الخلية فى العام فى مدينة بلينجهام

بإنجلترا، ومنذ ذلك الحين، عمل المصنع بشكل متقطع وكان ينتج ٦٠٠٠ طناً مترياً في الشهر، وكانت البكتيريا تنمو على الميثانول كمادة لتزويدها بالطاقة. ويعطى اثنان طناً مترياً من الميثانول طناً مترياً واحداً من "البروتين" الجاف، كبروتين من الكائنات وحيدة الخلية، والمنتج المجفف المحتوى على نسبة ٧٢% بروتين و٨% رطوبة، يتم بيعه كعليفة حيوانية في أسواق أوروبا الغربية.

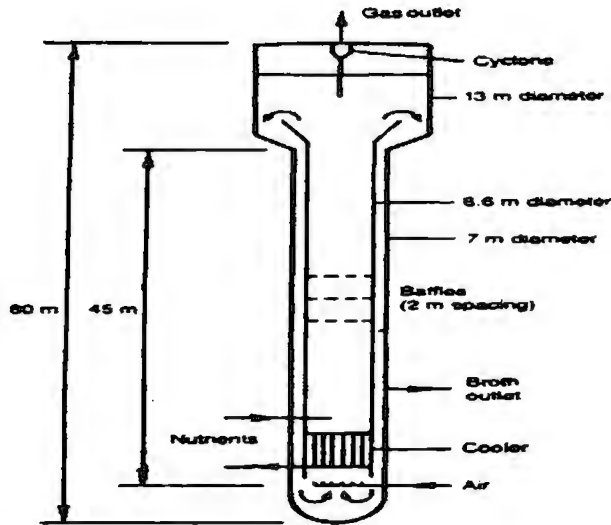
ولما كان فول الصويا المجروش يباع حالياً بسعر ٩٠ دولار للطن المتري، لذا لم يعد البروتين منافساً كمادة غذائية حيوانية، ولا يجري تشغيل المصنع على المستوى التجاري حالياً، وبرغم ذلك، فإن تطوير عملية (ICI) لصنع بروتين من وحيدات الخلية، يعطى مثلاً لتطبيق الهندسة الكيميائية الحديثة في مجال التكنولوجيا الحيوية.



شكل ١-٦ شكل تخطيطي لعملية الإنتاج المستمر للبروتين من البكتيريا وحيدة الخلية، ويجري إدخال الملمح المحتوى على البكتيريا إلى خزان التخمر (م)، ويجب تعقيم المواد الغذائية الأساسية (الميثانول، الأمونيا، حمض الفسفوريك والأملاح المعدنية في هذه الحالة) قبل إضافتها لمنع دخول البكتيريا التي يحتمل أن تلوث المنتج، ويجب أن تزود محتويات جهاز التخمر بالهواء والماء المبرد، لتستتبع الحرارة المتولدة أثناء نمو البكتيريا. وفي نظام الإنتاج المستمر للبروتين، يجري إضافة المواد الغذائية بمجرد استهلاكها للحفاظ على التركيز المطلوب للنمو البكتيري، ويعالج المحلول المحتوى على البكتيريا المسحوبة لجعل البكتيريا تتكاثرت أو تتبلد وتثيد، وقد يمكن إعادة المحلول إلى جهاز التخمر مرة أخرى في الوقت الذي يجري فيه تجفيف البكتيريا بالرش وطحنها للحصول على المنتج النهائي.



شكل ٢-٦ رسم تخطيطي لجهاز التخمير من نوع baffled stirred-tank ، والهواء الذي به الجهاز يجرى تشتيته بواسطة وسيلة تقليب تشبه المروحة، وتصل المصدات البارزة من جوانب الخزان الدخالية (الشبيهة بالمثلث) على خلط محتويات الخزان وترويده بالأكسجين.



شكل ٣-٦ رسم تخطيطي لجهاز تخمير IC العزود بدورة ضغط ، تبلغ سعة هذا الجهاز ١٥٠٠م^٣ مكعبا، ويتم إدخال الهواء المضغوط من فتحة في قاع الجهاز وتخلط المحتويات بواسطة فقاعات الهواء الصاعد، وتساعد المصدات التي يزود بها الجهاز على الإمداد الجيد بالأكسجين عن طريق تشتيت فقاعات الهواء، التي تتمدد مع صعودها ضد تحدار الكبس الهيدروليكي في الجهاز.

أثناء تطوير شركة ICI لمنتج "البروتين"، بحث علمائها إمكانية تحسين تحول الإيثانول إلى بروتين من وحيدات الخلية عن طريق التعديل الوراثي للبكتيريا *M.methylotrophus* لكي يستخدم الأمونيا كمادة نمو، وقاموا بإدخال جين في البكتيريا لتخليق إنزيم لهضم الأمونيا وتمثيلها، ويكون أكثر كفاءة من الإنزيم الموجود داخل البكتيريا، وعلى الرغم من أن الجين الجديد كان ثابتاً في البكتيريا وقام بالتعبير عن الإنزيم هناك، إلا أنه حدثت زيادة تتراوح ما بين ٣% إلى ٥% فقط من نتاج البروتين من الناتج من السلالة البكتيرية المعدلة وراثياً.

الخمائر

Yeasts

تطورت التكنولوجيا الحديثة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية تطوراً كبيراً منذ الحرب العالمية الثانية، ويجرى حالياً في العديد من الدول إنتاج منتجات الخميرة على المستوى التجارى للاستهلاك الآمى والحيوانى (جدول ٦-٥)، بالإضافة إلى ذلك، تباع حالياً خميرة الخبز التى تنمو على المولاس فى صورة مكون غذائى ومادة تكسب النكهة فى الطعام، بالإضافة إلى استخدامها كعامل لتخمير الخبز.

ويمكن تربية الخميرة على عدد من الركائز، التى تشمل مواد كربوهيدراتية فى كل من صورتىها المعقدتين مثل، النشا والبسيطة مثل سكريات الجلوكوز والسكروز واللكتوز، ويمكن اختيار بديل مثل المواد الخام المحتوية على السكر مثل شراب الذرة و المولاس وشرش الجبن، ويمكن لبعض الخمائر أن تنمو على هيدروكربونات ذات سلسلة مستقيمة، والذى يتم الحصول عليها من البترول أو من الإيثانول أو الميثانول.

جدول ٥-٦ عمليات إنتاج تجارية نموذجية للبروتين من الخميرة وحيدة الخلية.

الجهة المنتجة	المنتج	الإنتاجية	الخميرة	كمية الخام
مؤسسة الأغذية العالمية، جاتو، ويسكنون	خميرة الطعام مغذى للتخمير	٥٠٠٠ طن/ سنة	Kluyverom-yces fragilis	شرش الجبن
منتجات المزارع النقية، هتسنون مينسوتا	خميرة تريولا مكون غذائي	١٠٠٠٠ طن/ سنة	Candida utilis	الإيثانول
معهد أبحاث الاتحاد العام للتخليق الحيوي للبروتين، روسيا	خميرة طعام	٢٠٠٠٠ - ٤٠٠٠٠ طن/ سنة	Candida Gullienmon-dis	N-paraffins
مؤسسة رينلاندر للورق، رينلاندر، ويسكنون	خميرة تريولا	١٥ طن/ يوم	Candida utilis	مخلفات الكبريتيت

وتحتاج الخميرة بالإضافة إلى مصدر الكربون إلى مصدر نيتروجين، ويمكن تزويد النيتروجين بإضافة الأمونيا أو أملاح الأمونيوم إلى وسط المزرعة، وتحتاج الخميرة أيضاً إلى إضافة من المواد الغذائية المعدنية.

وتشابه الاحتياجات المطلوبة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية تلك الاحتياجات التي ذكرناها بالنسبة للبكتيريا، ويجب أن يكون للخميرة فترة تكاثر تتراوح ما بين ٢ إلى ٣ ساعات، ويجب أن تتحمل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وأن تكون ثابتة وراثياً، وتعطى إنتاجاً مرضياً من الركيزة المستخدمة ولا تسبب أمراضاً للنبات أو الحيوان أو الإنسان.

وتشابه التكنولوجيا المستخدمة في إنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية التكنولوجيا المستخدمة في صنع المنتجات البكتيرية (شكل ٦-٤)، ويعتبر جهاز التخمير من نوع الخزان المتحرك بواسطة الصدادات، من أشهر الأنواع المستخدمة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية، على الرغم من إمكانية استخدام أجهزة التخمير من نوع الهواء الصاعد air-lift fermentor، وكما هو

الحال فى المزارع البكتيرية، فإن الحرارة تتبعث أثناء نمو الخميرة، ولذا يجب أن يزود جهاز التخمير بنظام للتبريد.

ويمكن إجراء تخمرات الخميرة إما بنظام العبوة batch أو بالنظام المستمر continuous mode أو بنظام ثالث يسمى "fed-batch" العبوة الملقمة، وفى عمليات "fed-batch"، تضاف الركيزة والمواد الغذائية الأخرى بطريقة متزايدة للوفاء بمتطلبات نمو الخميرة فى الوقت الذى يحتفظ فيه بتركيز غذائى قليل جداً فى وسط النمو فى أى وقت، وتعطى هذه الطريقة من ٣,٥% إلى ٤,٥% من الوزن الجاف من المنتج بالمقارنة بـ ١ إلى ١,٥ من الوزن الجاف من المنتج فى حالة استخدام نظام العبوة. ويجرى جمع الخلايا فى نظام fed-batch processes بنفس طريقة نظام العبوة.

وبالرغم من استخدام نظامى استزراع "fed-batch" والعبوة batch فى إنتاج خميرة الخبز لسنوات عديدة، إلا أن التكنولوجيا التى طورت فى الآونة الأخيرة استطاعت أن تضبط وتراقب الأس الهيدروجينى وتركيز الركيزة، حتى يمكن استخدام عمليات النظام المستمر، حيث يمكن الحصول على تركيز من خلية الخميرة تصل إلى ١٦% (وزن جاف) من نظام العمليات المستمر.

وللخمائر مميزات معينة تفوق البكتيريا فى إنتاج البروتين من وحيدات الخلية، السبب الأول، أن الخمائر تتحمل وسط حمضى أعلى يتراوح ما بين ٣,٥ إلى ٤,٥ بالمقارنة بالأسس الهيدروجينية القريبة من التعادل التى تفضلها البكتيريا. ونتيجة لذلك يمكن أن تعمل عمليات إنتاج البروتين من الخميرة بنظام نظيف غير معقم عند أس هيدروجينى يتراوح ما بين ٤ إلى ٤,٥، لأن معظم

السلالات البكتيرية المسببة للتلوث لا يمكنها أن تنمو فى هذه الدرجة من الحمضية، والسبب الآخر، يبلغ قطر خلية الخميرة حوالي ٥,٠٠٠ سم بالمقارنة بقطر الخلية البكتيرية الذى يبلغ ١,٠٠٠ سم، ونظراً لحجم خلية الخميرة الأكبر، فإنه يمكن فصلها من وسط النمو بواسطة النبذ الناتج عن الطرد المركزى دون الحاجة إلى إجراء مرحلة تلييد.

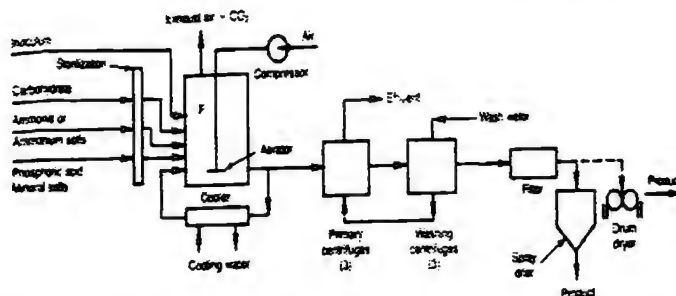
ويتوقف إنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية على الوفاء باحتياجات مزارع التريبة من الأكسجين، حيث تتطلب الخميرة التى تنمو على الكربوهيدرات بصفة عامة كيلوجراماً واحداً تقريباً من الأكسجين لإنتاج كيلوجراماً واحداً من وزن الخلايا الجافة، وعندما تربي على الهيدروكربونات فإنها تحتاج لحوالى ضعف هذا المقدار من الأكسجين، ويزود الهواء الذى يجرى تعقيمه إما بواسطة مصفاة أو أنابيب مخرمة من خلال فتحة فى قاع الوعاء (جهاز التخمر)، أو بواسطة عجلة تهوية دوارة أو جهاز رفع هوائى، مشابه لتلك الأجهزة المستخدمة فى زراعة الخلايا البكتيرية،

ويمكن إنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية إما تحت ظروف تعقيم أو ظروف نظيفة وغير معقمة، وفى عملية نموذجية من عمليات العبوة أو العبوة التى يجرى تغذيتها، التى يستخدم فيها الكربوهيدرات كمصدر للطاقة والكربون، يعقم الوسط المزرعى من خلال مروره على مبادل حرارى، ثم يلقم فى أجهزة تخمر نظيفة، ويتأسس التحكم فى التلوث على الحصول على أس هيدروجينى يتراوح ما بين ٤ إلى ٥، والتزويد بهواء معقم، والاحتفاظ بكميات كبيرة من خلايا الخميرة فى جهاز التخمر للقضاء على أية أعداد صغيرة من الكائنات المجهرية المسببة للتلوث، وفى بعض عمليات التخمر المستمرة

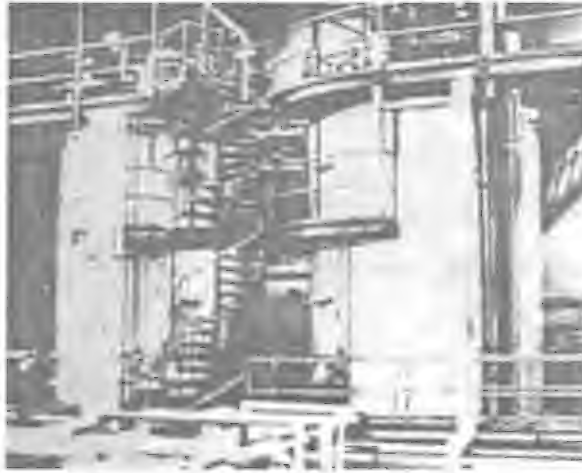
للخميرة، التي تستخدم الهيدروكربونات أو الإيثانول كركيزة، تحتاج هذه العمليات إلى ظروف تعقيم كاملة للحصول على المقادير المطلوبة والمنتج الجيد.

وتصنع الخميرة من نوع *Candida utilis*، والتي تعرف باسم تريولا *torula* وتستخدم للاستهلاك الآدمي وكعليقة للحيوان من سلسلة كبيرة من المواد الخام والتي من بينها الإيثانول ومخلفات سائل الكبريتيت من مصانع الورق وهيدروكربونات البرافين الطبيعي وشرش الجبن، وينتج قسم المنتجات الزراعية النقية في شركة هركيولز *Hercules*، الخميرة من نوع *Candida utilis* في مصنع بمدينة هتسنسون بولاية مينيسوتا، وتبلغ السعة الإنتاجية للمصنع ٧٥٠٠ طناً أمريكياً (الطن الأمريكي = ٢٠٠٠ باوند) في العام (شكل ٦-٥).

ويعمل المصنع بطريقة مستمرة ومعقمة، ويستخدم الإيثانول كمصدر للكربون والطاقة، ويجرى سحب خلايا الخميرة بصورة مستمرة، حيث تغسل وتجفف بالرش لإنتاج منتج بمستوى غذائي، تجرى عليه عملية تصنيع أخرى لإنتاج مكسبات النكهة للطعام، ويبلغ الناتج النموذجي حوالي ٠,٧ طناً مترياً من الخميرة على أساس الوزن الجاف من كل طن متري من الإيثانول المستهلك، ويصل المحتوى البروتيني في المنتج من ٥٠% إلى ٥٥%.



شكل ٦-٤: رسم تخطيطي لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية بواسطة الكربوهيدرات، ويضاف الملقم المحتوى على خلايا الخميرة إلى جهاز التخمر (م) مع المواد الغذائية الأساسية، التي تشمل الأمونيا وحامض الفسفوريك وأملاح المعادن والكربوهيدرات كمصدر للطاقة والكربون، ويجري تهوية خزان جهاز التخمر عن طريق الهواء المضغوط ويبرد بالماء، ويجري فصل خلايا الخميرة من حساء التخنية بواسطة الفلتر المركزي ثم يجرى غسل الخلايا وترشيحها وتجفيفها إما بواسطة رشاش أو مجفف أسطواني.



شكل ٦-٥ خزانات تخمر لإنتاج خميرة التريولا الصالحة للاستخدام الأدمى فى مصنع يقوم بتشغيله قسم منتجات المزرعة النقية
لشركة هركولز فى هنشسون بولاية مينيسوتا، وتبلغ القدرة الإنتاجية للمصنع ٧٥٠٠ طناً أمريكياً فى العام من خميرة التريولا .
ويستخدم هذا المنتج كوجبة غذائية للاستهلاك الأدمى والمحرولى.

وتنتج أيضاً المصانع التى تعمل بمستوى تجارى فى الولايات المتحدة وأوروبا خميرة الـ C.utilis من مخلفات سائل الكبريتيت، وفى عملية نموذجية، يعالج سائل الكبريتيت المحتوى على خليط من السكريات بالجير وبواسطة البخار المزيل لنزع ثانى أكسيد الكبريت والكبريتات والمركبات الكبريتية الأخرى التى تعوق نمو الخميرة، والعملية من النوع النظيف غير المعقم كالتى ذكرناها من قبل، ويجرى استخلاص المنتج بالنبذ بالطرد المركزى، والغسيل والتجفيف.

ويمكن أن يجرى إنتاج إما منتج غذائى حيوانى أو آدمى من سائل الكبريتيت، ويتوقف الإنتاج على نظام التشغيل وضوابط التحكم فى جودة المنتج التى تفرض عليه. وتعطى طرق مخلفات سائل الكبريتيت إنتاجاً يصل إلى طن مترى واحد من الخميرة الجافة من كل طنين من السكر فى السائل.

وفى فترة الستينات، طورت شركة البترول البريطانية المحدودة وشركات أخرى، وبخاصة شركة كانجفيوشى المحدودة للصناعات الكيميائية فى اليابان، عملية على المستوى التجارى لإنتاج البروتين من خميرة كانديدا وحيدة الخلية بواسطة هيدروكربونيات متصلة السلسلة مستخدمة كركيزة، وفى أوائل الستينات أنشأت شركة البترول البريطانية مصنعاً ذا قدرة إنتاجية ١٠٠٠٠٠ طناً مترياً فى العام فى جزيرة سردينيا بالبحر المتوسط . وتطلبت عملية المصنع استخدام هيدروكربونيات البارافين ذى نقاوة تتراوح ما بين ٩٥,٧% إلى ٩٧%، والتي كانت تحضر بالفرز الجزيئى molecular sieving، وصمم جهاز التخمر الذى تقلب محتوياته بالهواء لكى يعمل بصورة مستمرة وفى ظل ظروف تعقيم.

وعلى الرغم من الانتهاء من إنشاء المصنع، إلا أنه لم يعمل بالمستوى التجارى، بسبب نزاع نشأ بين شركة البترول البريطانية والحكومة الإيطالية على جودة المنتج، تعلق بوجود مخلفات هيدروكربونية، ويقوم فى الوقت الحالى معهد كل الأبحاث المتحدة للتخليق الحيوى للبروتين فى روسيا بتشغيل مصنعه الوحيد على المستوى التجارى، لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية بواسطة الهيدروكربونيات، وقد أعلن أن قدرة التشغيل وصلت فى حدود من ٢٠٠٠٠ إلى ٤٠٠٠٠ طناً مترياً فى العام، ويستخدم الإنتاج فى صورة علف حيوانى. وتصل إنتاجية البروتين من الخميرة وحيدة الخلية والذى تستخدم فيه هيدروكربونيات البارافين إلى مقدار ٠,٩ طناً مترياً من الخميرة الجافة من كل طن متري من الهيدروكربون، وتصل نسبة المحتوى البروتينى المستخرج من أنواع خميرة كانديدا فى العمليات التى تستخدم فيها الهيدروكربونيات فى حدود تتراوح

ما بين ٦٠ إلى ٦٥، التي تعتبر أعلى نوعاً ما من نسبة المحتوى البروتيني من نوع C.utilis.

وينتج من الشرش حوالي ١٤ مليون كيلوجراماً كل عام من تصنيع أنواع الجبن في الولايات المتحدة، ويحتوي شرش الجبن على نسبة ٤% من اللاكتوز، الذي يستخدم كركيزة لخميرة من نوع *fragilis* (*Kluyveromyces fragilis*).

وتقوم شركة ملوكي العالمية للأغذية في جانو بولاية وسكونسن، بتشغيل مصنع لإنتاج خميرة *fragilis* من شرش الجبن، الذي يجمع من مصانع الجبن المجاورة، وبعد أن يلقم وسط النمو المحتوى على الشرش، تنمو الخميرة بتركيز ثابت يصل إلى بليون خلية في المليمتر في غضون من ٨ إلى ١٢ ساعة، ثم تدار العملية بعد ذلك بنظام التغذية المستمرة بالشرش المخفف والمواد الغذائية، مع سحب منتج الخميرة، وتصل الإنتاجية ما بين ٠,٤٥ إلى ٠,٥٥ كيلوجراماً من الخميرة الجافة لكل كيلوجرام من اللاكتوز المستهلك.

ويصنع كل من المنتجات المعدة للاستهلاك الآدمي والحيواني بهذه الطريقة، ويحتوي المنتج المعد للاستهلاك الحيواني على ٤٥% من البروتين الخام و ٣% من الرطوبة، بينما يحتوي المنتج المعد للاستهلاك الآدمي على نسبة حوالي ٥٠% من البروتين، وفي فرنسا، تصنع شركة بل فورماجوري منتج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية بطريقة مشابهة في مصنع بمدينة فندوم أخيراً .

طورت شركة فيليبس للبترول في بارتسغيل بأوكلوهاوما عملية جديدة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية، تعطى تركيزات خلوية أعلى من الطرق القديمة، وفي هذه العملية التي حصلت على براءة اختراع عام ١٩٨٣، حقق التصميم الجديد لآلية تقليب جهاز التخمير أعلى معدلات لنقل

الأكسجين والتخلص من الحرارة العالية جداً. ويصل تركيز الخلية ما بين ١٢% و ١٦% من وزن المادة الجاف عندما تنمو الخميرة من نوع *C. utilis* على ركائز مثل إيثانول وسكروز ومولاس، أو عندما تنمو *K. fragilis* على شرش الجبن، وتعطى طرق الـ *fed-batch* الأكثر تقليدية تركيزاً يدور حول ٤% كما ذكرنا من قبل، ونتيجة للتركيز المرتفع الذى يتم الحصول عليه من طريقة فيليبس، يمكن أن ينقل وسط المزرعة مباشرة إلى المجفف الرشاش دون حاجة إلى تركيزه فى البداية، والنتيجة هى توفير قدر كبير من تكاليف الطاقة.

العفن والفطريات العليا

Moulds and higher fungi

تستخدم العديد من الفطريات العليا كغذاء آدمى، وأحد الأمثلة على ذلك عش الغراب التجارى المشهور من جنس *Agaricus campestris* ، تنمو هذه الأنواع من عشب الغراب على سماد حيوانى، أو سماد متكون من أعشاب متحللة، وزرع اليابانيون عشب الغراب الشيتاك من جنس *Cortinellus berkelyanus* على كتل خشبية كبيرة لبعض الأشجار، والتي تم تلقيم بمزيج معلق من بوغات الفطر، وفى الصين يزرع عشب الغراب بانستروى من نوع *Volvaria volvacea* على قش الأرز المبلل، ويجرى تلقيمه ببوغات من هذا الفطر.

وعلاوة على ذلك، يجرى إنتاج العديد من أطعمة المخمرة كالأرز والأسماك وفول الصويا فى آسيا بواسطة الفطر، وتشمل الأنواع الأخرى من الفطريات التى تستخدم كوجبة آدمية نوع *Trichosporon pullulans* الذى زرع خلال الحرب العالمية الأولى، وكان يزرع هذا الفطر فى أطباق مسطحة قليلاً تحتوى على وسط سائل يتكون من السكر، ويعتبر الفطر الغصينى، وهو الشبكة الخيطية

المتكونة من الفطر النامي من الفطريات الغنية بالدهون، وكان يجمع ويستخدم كمعجون.

والإنتاج الحالى من البروتين من الفطر وحيد الخلية، يتم الحصول عليه بطرق مشابهة لتلك الطرق المتبعة فى إنتاج منتجات الخميرة، وتعتبر السكريات البسيطة والمواد الخام المحتوية عليها من الركائز ملائمة لعدد كبير من الفطريات. ويصل تركيز المواد الكربوهيدراتية فى وسط النمو النموذجى حوالى ١٠%. وتعتبر الأمونيا أو ملح الألمنيوم من مصادر النتروجين المعتادة، وتضاف عادة إلى وسط المزرعة إضافات من مواد التغذية المعدنية. وتعتبر معدلات نمو الفطر والفطريات العليا التى تتراوح ما بين ٤ إلى ١٦ ساعة من معدلات النمو البطيئة بالمقارنة بمعدلات نمو الخميرة والبكتيريا، وينمو العفن والفطريات العليا فى درجات حرارة ما بين ٢٥ إلى ٣٦ درجة مئوية، ويتراوح الأس الهيدروجينى ما بين ٣ إلى ٧، إلا أن معظمها يزرع فى وسط حمضى أقل من ٥ للتقليل من التلوث الناشئ عن البكتيريا.

ويمكن استخدام نظم العبوة والعبوة المطعمة أو التشغيل المستمر لإنتاج البروتين من الفطر وحيد الخلية، على أنه يستخدم فى معظم الأحوال نظام العبوة فى أجهزة التخمير التقليدية المزودة بالهواء، الذى يعتبر البديل الأقل تكلفة. وتجرى عمليات التخمير فى ظل ظروف تعقيم ملائمة عندما يستخدم المنتج البروتينى للاستهلاك الآمى، فى حين يمكن إنتاج الفطريات المعدة للاستهلاك الحيوانى فى ظروف نظيفة دون الحاجة إلى إجراءات التعقيم، ومثل أى من نظم التخمير الأخرى، يجب تزويد المخمر بوسيلة تبريد للتحكم فى الحرارة المنبعثة أثناء نمو الفطريات.

وعندما يستزرع العفن والفطريات العليا فى أجهزة تخمر مزودة بالتهوية، فإن الفطر النامى إما أن يكون فى صورة خيطية أو حبيبية، ويتوقف ذلك على الأنواع المستخدمة وظروف التهوية، وتساعد الصورة التى يتكون بها الفطر المنتج على سهولة استخلاص المنتج، حيث يمكن فصل الفطر الخيطى أو الحبيبي بسهولة من الوسط بواسطة المصافى أو المرشحات الفايكومية الدوارة أو مكابس الترشيح بتكلفة بسيطة، ومع ذلك، لا تعتبر الأوعية المزودة بالهواء بصورة آلية ملائمة لنمو الكائنات العضوية، حيث تتركز خيوط الفطر حول عمود الدوران، ولا تنتشر بانتظام خلال وسط النمو، ويمكن حل هذه المشكلة، إذا استخدمت أجهزة التخمر التى تقوم فيها التهوية بدور التقليل للوسط.

وطورت بعض الشركات عمليات لإنتاج البروتينات من الفطر وحيد الخلية (جدول ٦-٦). وتقوم شركة راكس هوفز مكوجال المحدودة بالملكة المتحدة بصنع منتج يسمى ميكوبروتين Mycoprotein، ينتجه الفطر *Fusarium graminearum* لسوق الغذاء الآدمى، ويستخدم الجلوكوز كمصدر لتزويد الفطر بالطاقة، الذى تصل دورة تكاثره إلى حوالى خمس ساعات ونصف الساعة، ويصل الناتج إلى حوالى ٠,٥ كيلوجرام من وزن الخلايا الجاف من كل كيلوجرام واحد من السكر المستهلك.

جدول ٦-٦ عمليات مختارة على المستوى التجارى لإنتاج البروتين من الفطر وحيد الخلية.

المادة الخام	الكائن العضوى	الإنتاجية	المنتج	الجهة المنتجة
جلوكوز يستخدم كغذاء	Fusarium graminear-um	١٠٠-٥٠ طن/سنة	ميكوبروتين (غذاء بشرى)	رانكس هوفز مكدوجال، هاى وايكومب، المملكة المتحدة
شرش الجبن	Penicillium cyclopium	٣٠٠ طن/سنة	غذاء حيوانى	هيوتري أس.أ فرنسا
مخلفات البن	Trichoderma harzianum	٤٠٠٠ لتر	غذاءى حيوانى	ICAITA جواتيمالا والسلفادور
مخلفات مائل الكبريت	Paecilomyces varioti	١٠٠٠٠ طن/سنة	غذاء حيوانى (بروتين بكميو)	معهد أبحاث تامبلا ولباب الورق، جامسانكو كسي، فنلندا
مخلفات مصانع لب الورق	Chaetomium cellulolyticum	طن واحد/يوم	غذاء حيوانى (عملية ووترلو)	إيفك ورن المحدودة، فانكوفر بى، كندا، جامع ة ووترلو، لورينتو.

وتعالج المادة المنتجة لتقليل محتوى الحمض الريبى النووى RNA، حيث يسبب الاستهلاك البشرى لأكثر من ٢ جرام فى اليوم حصوات فى الكلى أو الإصابة بداء النقرس، وبعد ترشيح كعكة الفطر الخيطية، يمكن أن تضاف إليها بعض النكهة، وتشكل فى منتج يشبه لحم الدجاج الأبيض، ولها محتوى بروتينى يصل إلى ٤٥ %، وتصل القدرة الإنتاجية لمصنع رانكز هوفز مكدوجال من ٥٠ إلى ١٠٠ طن فى العام، لكنه يجرى حالياً إنتاج كميات قليلة لدراسة نوق المستهلك فى المملكة المتحدة.

وفى خلال فترة الستينات طورت عمليات عديدة لإنتاج أفطورة عش الغراب لاستخدامها كعنصر يكسب الغذاء النكهة، وعلى سبيل المثال يزرع قسم المنتجات الخاصة فى شركة ميد أمريكان دايرمن فى سبرنجفيلد بولاية ميسورى أفطورة عش الغراب الغشونة morel فى مزرعة مغمورة بالماء ومزودة بالهواء بدلاً من الركائز الجافة التى كانت تستخدم عادة فى زراعة جميع أنواع عش

الغراب، وكان يلقم وسط النمو الذى يحتوى على الجلوكوز وشراب الذرة المنقوع وفوسفات الأمنيوم ببوغات عش الغراب فى جهاز تخمر تقليدى مزود بالهواء، وبعد حوالى أربعة أيام كان يجمع الأقطور، يعطى منتجاً يستخدم لإكساب النكهة للحساء والمقانق (السجق) والصلصات والأطعمة الأخرى، إلا أن عملية الإنتاج قد توقفت عندما استورد عش الغراب بأسعار رخيصة.

وفى بعض العمليات، لم يقتصر استخدام الفطريات على اعتبارها مصدراً لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية، لكنها استخدمت أيضاً فى تنظيف المخلفات الناتجة عن تصنيع الغذاء والمعامل الصناعية، واختبر المعهد الأمريكى المركزى لأبحاث الصناعة (ICAITI) فى جواتيمالا، استخدام الفطر من نوع *Trichoderma harzianum* لمعالجة المخلفات الناتجة عن تصنيع البن فى السلفادور، فى حين جرى فى نفس الوقت استخلاص البروتين من الكائنات وحيدة الخلية لتقديمها كعلف حيوانى، وكان النظام الذى اختبرته الشركة يعمل فى ظروف غير معقمة. وازداد محتوى المواد الصلبة الميكروبية بحوالى ٣,٢ جرام لكل لتر فى خلال ٢٤ ساعة، واحتوى المنتج على ٦٥% بروتين من الوزن الجاف، وقد تم تشغيل المصنع كوحدة إرشادية.

وفى فنلندا، اشترك معهد أبحاث الورق واللباب الفنلندى مع تامبيللا *Tampela* لتطوير عملية بكيو "Pekilo" التى استخدمت فطر *Paecilomyces varioti* لتقليل قدرات مخلفات سائل الكبريتيت المستهلك على التلوث، وأعطى التخمر حوالى ٣ جرامات من الميسيليوم الفطرى لكل لتر من وسط النمو فى الساعة الواحدة، واستخلص البروتين الفطرى بواسطة الترشيح ثم غسل وجفف، وكانت تصل نسبة المحتوى البروتينى فى البروتين الذى كان يستخدم كغذاء حيوانى ما بين ٥٥% إلى ٦٠%. وكانت القدرة الإنتاجية للمصنع الفنلندى ١٠٠٠٠

تمادة فى العام، وهو رقم يدل على أن هذه العملية تعد من أكبر العمليات لمنتجة للبروتين من الفطر وحيد الخلية، إلا أن الظروف الاقتصادية الحالية، لا تسمح باستمرار الإنتاج من بروتين بكليو.

ويمكن أيضاً تحسين قيمة المخلفات الزراعية أو الناتجة من الغابات أو من تصنيع الأغذية لاستخدامها كغذاء للحيوان من خلال معالجة "الركيزة الصلبة"، لى تعطى حمأة شبه صلبة، تحتوى على نسبة رطوبة من ٥٠% إلى ٨٠% ثم يضاف إليها بعد ذلك سماد تجارى لتزويدها بعنصرى النتروجين والفسفور.

وتشمل أجهزة التخمير التى تستخدم طرق الركيزة الصلبة، الأطباق البسيطة المزودة بالهواء والأبراج المزودة بالهواء والأسطوانات الدوارة والأوعية الأنبوبية المسحوجة والخزانات المقلبة وركم الرياح.

وطور الباحثون فى جامعة ووترلو فى أورينتو بكندا طريقة لاستخدام الفطر *Chaetomium cellulolyticum* لتحويل الكربوهيدرات السليلوزية الموجودة فى مخلفات مصانع الورق والغابات والزراعية إلى منتج بروتينى من كائنات وحيدة الخلية، وأنشأت شركة Envirocon Ltd مصنعاً إرشادياً فى فانكوفر فى كولومبيا البريطانية، الذى تأسست على عملية ووترلو، وكانت قدرته الإنتاجية طناً واحداً فى اليوم من البروتين من الكائنات وحيدة الخلية.

ويجرى تحضين الحمأة المعقمة فى مصنع لباب الورق مع فطر *C. cellulolyticum* ، ويضاف إليها المواد الغذائية المناسبة فى جهاز تخمر سعته ٤٠٠ لتر لمدة ٢٤ ساعة، ثم ينقل المنتج من هذا المخمر إلى مخمر آخر سعته ٤٠٠٠ لتر، وبعد ٣٦ ساعة يصل التخمر لمرحلة يمكن أن يتم فيها الجمع المستمر للمنتج، والطريقة البديلة، يمكن تشغيل المخمر بطريقة العبوة،

ويمكن الحصول على ٠,٥ كيلوجرام من البروتين من وحيدة الخلية والذي يحتوى على ٤٢% بروتين من كل كيلوجرام واحد من الحماة.

أمان المنتج وجودته

Product quality and safety

نسب البروتين المذكورة سابقاً فى كل المنتجات البروتينية المنتجة من كائنات وحيدة الخلية، هى قيم تقريبية مبنية على أساس قياسات محتويات النتروجين الكلية، وعلى الرغم من أن هذه القيم تتراوح ما بين ٤٥% إلى ٦٠% من وزن الخلايا الجاف، فإنه يدخل فيها جزء مهم من الأحماض النووية، التى تحتوى على النتروجين، وتشكل نسبة ٥% إلى ١٥% من وزن الخلايا الجاف، وهذه المواد لا تحتوى على قيمة غذائية للحيوانات غير المجتررة، وكما ذكرنا من قبل، يجب ألا يزيد تناول الإنسان من هذه المواد يجب عن ٢ جرام فى اليوم، ويمكن أن تزيل معالجة الخلايا بالأحماض أو القلويات أو الإنزيمات هذه الأحماض النووية.

بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يكون هناك نقص فى بعض الأحماض الأمينية الأساسية فى البروتين الناتج من الكائنات وحيدة الخلية، ولا تستطيع الحيوانات أن تخلقه لنفسها، وعلى سبيل المثال، أوضحت الدراسات التى أجريت على دجاج وخنازير الشى أهمية أن يضاف لمنتجات البروتين من وحيدات الخلية حمض الميثيونين methionine وهو الحمض الأمينى المحتمل وجوده بتركيزات غير كافية فى الوجبة الغذائية المثالية، بالإضافة إلى أنه يجب أن يتم بجرى ضبط محتويات أحماض الأرجينين arginine والليسين lysine فى الأطعمة التى تقدم

تحيوانات الأليفة (الكلاب، القطط،...ألخ). ويمكن تربية دجاج الشواء بطريقة ناجحة على غذاء يحتوى من ٧% إلى ١٥% بروتين من وحيدات الخلية. وتسمح التنظيمات الحالية لإدارة الغذاء والدواء الأمريكية حالياً باستخدام الخلايا الجافة من خمائر الخباز من أصناف التريولا والفراجليس ومركز بروتيني يستخرج من خميرة الخباز فى الغذاء الآدمى، وفى المملكة المتحدة، سمحت وزارة الزراعة والمصايد والأغذية بإجراء دراسات اختبار السوق لبدل الدجاج من الميكوبروتين، الذى أنتجته شركة رانكس هوفز ماكودجال من الفطر *F.graminearum*، وقد سمحت الوزارة أيضاً باستخدام الغذاء الحيوانى الذى أنتجته شركة الصناعات الكيميائية الإمبريالية من الخلايا المجففة من الفطر *M.methylotrophus*.

وطورت المجموعة الاستشارية للبروتين التابعة للأمم المتحدة مجموعة من القوانين الإرشادية لإنتاج وتقييم المنتجات البروتينية من الكائنات وحيدة الخلية، وتقدم مجموعة القوانين هذه معايير تحدد الجودة الغذائية وأمان المنتج، كما حددته دراسات التغذية التى أجريت على الفئران والدواجن والدواب مثل الدجاج والخنازير وعجول البتلو، وقد تتطلب الوكالات التنظيمية الحكومية اختباراً إضافياً على المنتجات لتحديد، ما إذا كانت تلك المنتجات يمكن أن يتسبب عنها سرطان أو نشوهات فى المواليد أو طفرات جينية.

اقتصاديات إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية The economics of single-cell protein production

تشمل العوامل المؤثرة على الجدوى الاقتصادية لإنتاج البروتين من الكائنات وحيدة الخلية : التكاليف الرأسمالية لإنشاء الوحدات الإنتاجية، وتكاليف تصنيع المواد الخام، الطاقة، العمالة، الصيانة، معالجة المخلفات والاستهلاك فى قيمة

المواد ،وموقع المصنع بالنسبة لموردى المواد الخام وموقعه بالنسبة لأسواق المنتج.

فى منتصف السبعينات،كانت تتراوح التكاليف الرأسمالية لإنتاج بروتين من كائنات وحيدة الخلية صالح للاستهلاك الآدمى من مادة الميثانول ما بين ٦٠دولاراً إلى ١٠٠٠دولار للطن المترى من المصانع ذات القدرات الإنتاجية السنوية من ٥٠٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠ طناً مترياً فى العام، وتقترب التكاليف الرأسمالية حالياً من ضعف القيم السابقة، ونتيجة لذلك،فليس من المثير للدهشة ألا يتم إنشاء الكثير من المصانع الجديدة ذات القدرة الإنتاجية التجارية، ومع ذلك،فقد أجريت تحسينات وأضيفت بعض المنشآت للمصانع القائمة .

وسوف يتوقف انتشار أسواق منتجات البروتين من الكائنات وحيدة الخلية كمادة غذائية حيوانية على أسعار المنتجات،ومدى الكفاءة التى تطور بها هذه المنتجات نمو دجاج الشواء ودجاج البيض والديوك الرومى والخنازير بالمقارنة بفاعلية المواد البروتينية الحالية، مثل فول الصويا والعليقة المصنعة من لحوم الأسماك.

وتوضح الدراسات المكثفة التى أجرتها شركة البترول البريطانية وشركة الصناعات الكيميائية الإمبريالية على المواد الغذائية المقدمة للماشية والدواب من منتجاتها البروتينية من الكائنات وحيدة الخلية،نتائج فاعلية أنواع التغذية المطلوبة للوفاء بمتطلبات العملاء ووكالات التنظيم الحكومية بقيمة هذه المنتجات للاستخدام كغذاء يقدم للماشية والدواب والدواجن، التى تشمل الدجاج والخنازير التى تربي للاستهلاك الآدمى.

وتعد النكهة والقوام بالإضافة إلى القيمة الغذائية من المتطلبات المهمة لقبول البروتينات من الكائنات وحيدة الخلية كغذاء آدمى، وتعتبر مثل هذه الاستخدامات

من المواد الغذائية التي تكسب النكهة أو تساعد في اختصار الخبز سوق رئيسي في الوقت الحاضر، فعلى سبيل المثال، استخدمت مشتقات البروتين المصنع من خميرة كمادة تكسب النكهة للأطعمة لسنوات عديدة. وتضاف تريولا الخميرة في تصنيع اللحوم كعامل مكسب للنكهة، وبطبيعة الحال تستخدم خميرة الخبز في صناعة الخبز والمنتجات المخمرة الأخرى، بالإضافة إلى ذلك، فأى منتج بروتيني من الكائنات وحيدة الخلية، يجب أن يفي بالمتطلبات التنظيمية للوكالات الحكومية قبل طرحه في الأسواق كغذاء للإنسان أو للحيوان.

المستقبل:

ما هو مستقبل المنتجات البروتينية التي تنتجها الكائنات المجهرية وحيدة الخلية؟ اتضح من هذه الدراسة الجوى التكنولوجية لتصنيع البروتينات من كائنات وحيدة الخلية بمقادير كبيرة، فهناك عدد محدود من العمليات التجارية يجري تنفيذها حالياً على نطاق محدود في بعض من الدول على مستوى العالم، وسوف يتوقف إدخال منتجات بروتينية جديدة من الكائنات المجهرية وحيدة الخلية بصورة أكبر على الاعتبارات الاقتصادية والتسويقية والتنظيمية، فضلاً عن المعوقات التكنولوجية. وفي غالب الظن، سوف يقتصر استخدام البروتينات من وحيدات الخلية أساساً على الإضافات البروتينية أو المكونات التي تؤدي وظائف معينة، على سبيل المثال، كالتى تستخدم كعوامل مكسبات للنكهة أو التخدير، وسوف تكون استخدامات البروتينات من كائنات وحيدة الخلية جذابة بصورة كبيرة في المجالات التي تكون فيها الركائز رخيصة التكاليف، مثل مخلفات المواد الكربوهيدراتية، وفي الوقت الذي يكون فيه نقص من المواد الغذائية البروتينية مثل، فول الصويا والعلف المصنع من لحوم الأسماك.

الفصل السابع :

الغسل البكتيرى والتعدين الحيوى

Bacterial leaching and biomining

كانت الكائنات المجهرية تشكل معادن القشرة الأرضية وتحللها منذ عصور جيولوجية سحيقة، وقد استفادت عمليات التعدين منذ أمد طويل من أنشطة تلك الميكروبات الموجودة بصورة طبيعية، وخاصة قدرة بعض أنواع البكتيريا على استخلاص المعادن من الخامات غير القابلة للذوبان، ولحقبة تعود إلى القرن العاشر قبل الميلاد، استخلص عمال المناجم النحاس فى منطقة حوض البحر المتوسط، الذى غسلته البكتيريا فى مياه صرف المناجم على الرغم من عدم درايتهم بالدور الميكروبى فى هذا المجال، وقد كان الرومان فى القرن الأول الميلادى ومن بعدهم أهالى ويلز فى القرن السادس عشر والأسبان الذين عملوا فى منجم ريو تينتو Rio Tinto فى القرن الثامن عشر، على يقين من استخدامهم الغسل الميكروبى فى استخلاص المعادن.

بيد أن إسهام البكتيريا فى غسل المعادن لم يكن معروفاً حتى فترة قريبة نسبياً، فلم ترد التقارير الأولى عن دور أنواع معينة من البكتيريا فى غسل كبريتيدات الحديد والزنك، والتى لم معروفة فى ذلك الحين، إلا فى العشرينيات من هذا القرن، وقد أهمل إلى حد كبير الدور الأساسى الذى تقوم به البكتيريا فى غسل المعادن حتى عام ١٩٤٧، عندما قام آرثر كولمر و M.E.Hinkle من جامعة ويست فرجينيا فى مورجان تاون بالتعرف على بكتير يسمى حالياً

بـ *Thiobacillus ferrooxidans* بأنه الكائن العضوى المسؤول بصفة رئيسة عن غسل خامات كبريتيد المعادن.

وحالياً يجرى استخدام الغسل البكتيرى بصورة ناجحة فى العديد من دول العالم لاستخلاص المعادن من سلسلة متنوعة من الخامات، والمعادن الرئيسية المستخلصة هى: النحاس واليورانيوم، على الرغم من أنه يمكن الحصول أيضاً على الكوبالت والنيكل والزنك والذهب. ، وفى عام ١٩٨٣ جاء ترتيب الولايات المتحدة فى إنتاج النحاس الثانى بعد إنتاج شيلي فقط، واستخلص ما يزيد على ١٠% من نحاس الولايات المتحدة عن طريق الغسل البكتيرى، وبلغت قيمة إنتاج النحاس فى الولايات المتحدة وحدها ما قيمته ٣٥٠ مليون دولاراً أمريكياً، واليورانيوم حوالى ٢٠ مليون دولاراً أمريكياً فى عام ١٩٨٥، وقد قدرت شركة جورهام إنترناشيونال Gorham International, Inc احتمال أن يصل الإنتاج السنوى على مستوى العالم من صناعة المعادن المستخلصة بواسطة الميكروبات فى عام ٢٠٠٠ إلى ٩٠ بليوناً من الدولارات.

وحظى التعدين الحيوى فى السنوات القلائل الماضية باهتمام متزايد، لما للتكنولوجيا من إمكانات تساعد على التخفيف من المشاكل العديدة التى تواجهها صناعة التعدين فى الوقت الحالى، وتتمثل إحدى هذه المشاكل الكبرى فى استنزاف ترسيبات المعادن جيدة الصنف high-grade mineral deposits والاحتياج الناشئ عن التعدين من أعماق كبيرة، وفى العديد من الحالات، يمكن استخدام البكتيريا فى غسل المعدن المطلوب من ترسيبات عميقة أو بمرتبعة منخفضة دون الحاجة لإزالته من باطن الأرض، وبالتالي تقل تكاليف جلب كميات هائلة من الخام أو مخلفات الصخر إلى سطح الأرض.

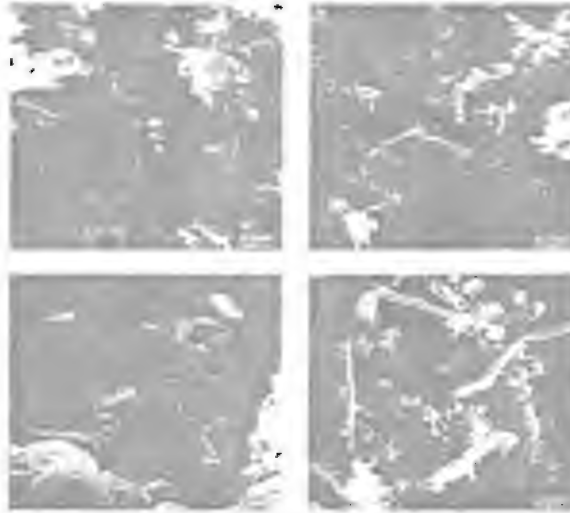
علاوة على ذلك، تستهلك العديد من النظم التقليدية لمعالجة خامات المعادن، خصوصاً تلك الخامات المقاومة للمعالجة الحرارية مقادير هائلة من الطاقة، وقد يكون البديل الموفر للطاقة، هو الغسل الحيوى للخامات والركائز، التى تتطلب قدراً قليلاً من الطاقة.

وللغسل الحيوى أيضاً فوائده البيئية المحتملة، فقد كانت المشكلة القائمة تكمن منذ أمد بعيد فى العديد من عمليات التعدين من الانبعاث غير المحكم للمعادن والأحماض الذى يحدث عندما تعمل البكتيريا على المخلفات الموجودة فى نفايات المنجم ومخلفات السدود، ويمكن أن يؤدى الغسل المحكم لمخلفات الصخر فى عمليات التعدين التقليدية إلى استخلاص المعادن المهمة من المواقع، بالإضافة إلى حماية البيئة من هذا المصدر من التلوث.

بالإضافة إلى ذلك، لا يمكن أن تحترق الاحتياطات الضخمة من الوقود الأحفورى حالياً، مثل الفحم والبتروول دون تلوث بيئى غير مقبول بسبب احتوائها على نسب عالية من الكبريت، وينجم عن احتراق الوقود المحتوى على الكبريت تصاعد حمض الكبريتيك إلى طبقات الجو، الذى يسهم فى إحداث "الأمطار الحمضية" acid rain، التى تصيب النباتات وصحة الحيوان بأضرار بالغة، خاصة فى شرق كندا والمناطق الشمالية الشرقية من الولايات المتحدة وبعض أجزاء من غرب أوروبا، ويمكن للغسل الحيوى أن يزيل الكبريت من الوقود الأحفورى.

بكتيريا الاستخلاص الحيوى Bioleaching bacteria

تم عزل عدة أنواع مختلفة من الكائنات المجهرية من الأماكن التى يجرى بها الغسل الحيوى (شكل ٧-١)، ومن أنواع الكائنات المجهرية الأكثر أهمية فى عملية الغسل : *Thiobacillus ferrooxidans* و *T.thiooxidans* و *Leptospirillum ferrooxidans* وعدد آخر من الكائنات المجهرية التى تنتمى لجنس *Sulfolobus*، وتكيفت جميع هذه الكائنات العضوية على المعيشة فى ظروف بيئاتها الطبيعية القاسية، ويمكنها تحمل المحاليل الحمضية وغالباً ما تعمل فى ظل درجات حرارة عالية وتستمد الطاقة التى تحتاجها للنمو من أكسدة المواد غير العضوية.



شكل ٧-١ مسح إلكترونى لصور مصغرة لكائنات مجهرية مصلحية لجزيئات خام، لجزيئات الخام فى الصورة (أ) و (ب) مضطأة ببكتيريا قضيبية الشكل، وترتبط البكتيريا ذات الشكل الخزائى بالجزيئات فى الصورة (ج)، أما فى الصورة (د) تحمل الجزيئات كل من البكتيريا والبروزات الخيطية الطويلة لميسيلوم فطرى.

والبكتيريا من جنس *T.ferrooxidans*، التى تعتبر أفضل ما تم دراسته من أنواع بكتيريا الغسل الحيوى، هى بكتيريا صغيرة قضيبية الشكل، تنمو بشكل جيد

على المحاليل شديدة الحمضية، ويتراوح الأس الهيدروجيني ما بين ١,٥ إلى ٢,٥ (فالماء النقي المتعادل له أس هيدروجيني ٧) وتستطيع هذه البكتيريا أن تستمد طاقتها من أكسدة حديد الحديدوز (Fe^{2+}) إلى حديد الحديدك (Fe^{3+}) ومن أكسدة الصور المختزلة من الكبريت إلى حمض كبريتيك، ويعتبر الأكسجين المتقبل المفضل للإلكترونات المزالة أثناء تفاعلات الأكسدة، وفي غياب الأكسجين، يمكن أن يستخدم الكائن العضوى حديد الحديدك كمتقبل إلكترون بديل لأكسدة الكبريت المختزل.

وللبكتيريا *T.ferrooxidans* متطلبات غذائية متواضعة جداً ، فكل السلالات ذاتية الاغذاء الإجمارى ،والذى يعنى أنها تستخدم ثانى أكسيد الكربون من الجو كمصدر وحيد للكربون لتخليق مكوناتها العضوية، وفي حقيقة الأمر، فهى لا يمكنها أن تنمو على مصادر كربون عضوية، وعلاوة على ذلك، تستطيع العديد من سلالات *T.ferrooxidans* أن تثبت النتروجين، إذ تحول النتروجين الجزيئى الموجود فى الجو إلى أمونيا ومواد غذائية أخرى تحتوى على النتروجين الذى تحتاج إليه، وبعد مزج عينة من بيريت الحديد (FeS) فى ماء محمض كافى لضمان نمو معظم السلالات على حساب البيريت.

وعلى الرغم من أن *T.ferrooxidans* تعتبر من أهم الكائنات العضوية فى استخلاص المعادن من خاماتها، إلا أنه يبدو أنها لا تعمل بمفردها، فغالباً ما توجد نامية مع أنواع البكتيريا الأخرى، التى تشمل البكتيريا من جنس *T.thiooxidans*، التى تقوم بأكسدة الكبريت، بالإضافة إلى البكتيريا *T.acidophilus*

و *Acidiphilium cryptum*، وغالباً ما تكون مزارع البكتيريا المختلطة أكثر كفاءة في تحليل الخام مما لو قامت به البكتيريا *T.ferrooxidans* وحدها.

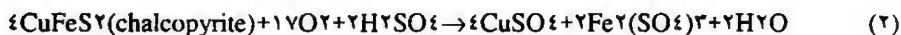
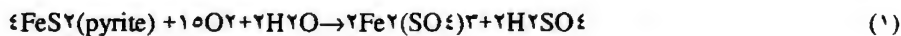
ويمكن أن يتم الغسل الحيوى للمعادن من خام الكبريت عند درجات حرارة تتراوح ما بين ٢٠° إلى ٨٠° مئوية، وفي درجة حرارة ٥٠° مئوية، يمكن عزل البكتيريا من جنس TH، والتي سميت بهذا الاسم لأنها محبة للحرارة *thermophilic* إلى حد ما، وتشابه البكتيريا *Thiobacillus* في بعض النواحي، ومع ذلك ففي درجات حرارة ما بين ٦٠ إلى ٨٠° مئوية، تقوم بعض أعضاء من جنس البكتيريا *Sulfolobus* باستخلاص المعادن من عدة خامات مختلفة، ولا تستخدم هذه الكائنات حالياً في عمليات الغسل على المستوى التجارى، بينما قد تثبت أهميتها في النهاية بأنها الكائنات النشطة بصورة خاصة في مهاجمة خامات المعادن التي تقاوم الاستخلاص عن أنواع البكتيريا الأخرى.

تفاعلات الاستخلاص

Leaching reactions

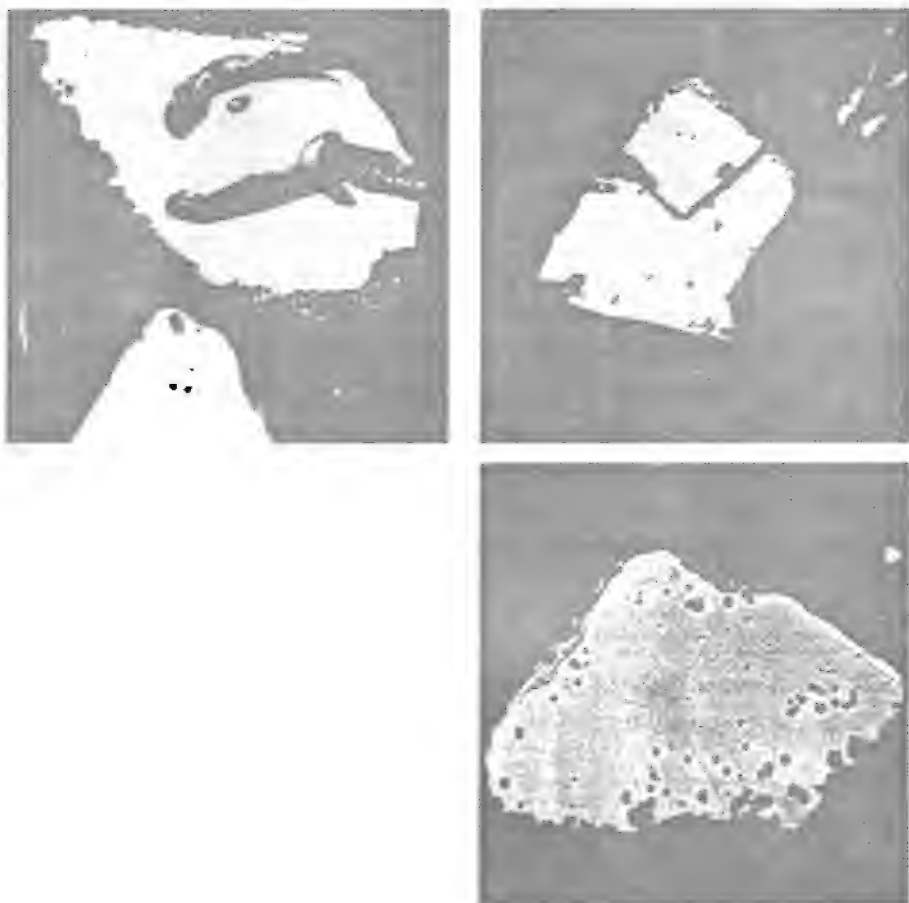
تتضمن تفاعلات الاستخلاص بصفة عامة، تحويل خامات المعادن غير القابلة للإذابة، والتي يغلب عليها أنواع الكبريتيدات، إلى مركبات قابلة للذوبان، التي يمكن أن يفصل منها المعدن المطلوب بسهولة تامة (شكل ٧-٢)، ويمكن لبكتيريا الاستخلاص القيام بهذا التحويل بصورة مباشرة عن طريق أكسدة كبريتيدات المعدن للحصول على حديد الحديدك، وحمض الكبريتيك

وكبريتيدات المعدن، التي تتوقف هويتها على نوع الخام، ونورد في ما يلي بعض الأمثلة لتفاعلات الاستخلاص التي تنتج عن الهجوم البكتيري المباشر:



والبدل عن ذلك ، فقد يكون الغسل البكتيري للمعادن بصورة غير مباشرة، فكما هو موضح في التفاعلات من (٥) إلى (٨)، فإن الحديد الحديديك وحمض الكبريتيك الناتجان من الأكسدة المباشرة لكبريتيدات المعدن، يمكنها أن تؤكسد بعض الخامات لتكوين الأكسيدات والكبريتيدات التي تذوب في المحاليل الحمضية، وعندما يكون الحديد موجود، فيحتمل أن يساهم كل من التفاعل البكتيري المباشر والتأثير الكيميائي غير المباشر في استخلاص خامات المعدن.





شكل ٦-٧ جزيلك بيريت ذات مسام غفيرة عميقة، تكونت أثناء الترشيح الحيوي، ويبلغ قطر الجزيلك حوالي ثمانون ميكرومتراً.

عمليات الغسل

Leaching operations

يمكن استخدام الغسل الحيوى فى استخلاص المعادن الثمينة من ترسيبات المعادن منخفضة المرتبة،والتي يوجد منها مقادير هائلة، وطبقاً لأحد التقديرات، فهناك ما يزيد على ٣٣ مليار كيلوجراماً من النحاس فى مقالب المناجم فى غرب الولايات المتحدة، ويحتوى أحد المقالب الموجودة فى بنجهام كانيون بولاية يوتاه الأمريكية على أربعة مليارات من الأطنان من المخلفات المعدنية منخفضة المرتبة، ذات محتوى نحاس أقل من ٠,٥ %.

ويتم تخطيط مقالب المناجم بحيث يمكن الاستفادة من الموقع الطبيعى للأرض،فهي تتشأ غالباً فى الأودية الطبيعية،بحيث ينساب الماء المستخدم فى غسل المقالب بطبيعته إلى موقع تجمع طبيعى أو سد، ومن هناك، يجرى ضخ السائل "الخصب" المحتوى على المعادن الذائبة التى تم غسلها من الخام فى مواسير إلى مصنع الاستخلاص.

ويلزم لاستخلاص مقلب فى أبسط صورته، غسل مخلفات الخام فى موقع المقلب على دورات تتراوح ما بين سبعة إلى عشرة أيام،تتخللها فترة راحة مساوية للفترة السابقة، وقد يزداد معدل استخلاص المعدن من المقلب بصورة كبيرة باستخدام محلول ترشيح بدلاً من الماء،ذى أس هيدرجينى يتراوح ما بين ١,٧ إلى ٢,٤، ويحتوى من اثنين إلى أربع جرامات فى اللتر من الحديد الحديديك. وفى مصنع الاستخلاص،غالباً ما يتكرر إزالة النحاس من سائل الترشيح الخصب عن طريق ترسيب المعدن بواسطة حديد معدنى لإنتاج نحاس

السمنتة cement copper الذى يجرى عليه تنقية أخرى بالانصهار smelting، كما يمكن استخلاص النحاس أيضاً عن طريق ترسيبه كهربياً على الكترودات مناسبة أو استخراجة بواسطة سائل مذيب.

وبعد استخلاص المعادن، يمكن تجديد مذيبات الترشيح وإعادة تشغيلها فى المقلب، وتتم عملية التجديد بمزج المحلول المستهلك بالهواء، وجعل البكتيريا المؤكسدة للحديد مثل T.ferrooxidans أن تقوم بتحويل حديد الحديدوز، الذى نتج أثناء الاستخلاص الكيميائى بأن يعود إلى حديد الحديدىك وحمض الكبريتيك (معادلات تفاعلات ٩ و ١٠) :



ومع ذلك، فمن الضرورى إضافة قليل من حمض الكبريتيك للحفاظ على أس هيدروجينى مناسب، ولما كان الترشيح فى المقلب يجرى بصورة بطيئة، فى مكن استخلاص مقدار ثابت نسبياً من المقلب لعدد من السنوات.

وقد يساعد الغسل المحكم للمعادن من مواقع المقالب على التقليل مما قد يشكل مصدراً خطيراً من مصادر التلوث، وغسل المعادن يتم بصورة طبيعية، وينجم عنه تلوث المناطق المجاورة بالأحماض والمعادن الثقيلة، فإلغسل المتأنى، الذى يجرى فى ه جمع السوائل المنسكبة، سيقول كثيراً من هذا التلوث.

تعالج الخامات عالية الرتبة بطريقة مختلفة نوعاً ما عن الطريقة التى تعالج بها مخلفات الخامات منخفضة الرتبة، وتكون مواد الخامات عالية الرتبة على قاعدة غير مسامية، لضمان عدم فقد محاليل الترشيح (أشكال ٧-٣ و ٧-٤ و ٧-٥)، وتوضع وسائل تجميع السائل وطريقة الغسيل الفعالة فوق أكوام

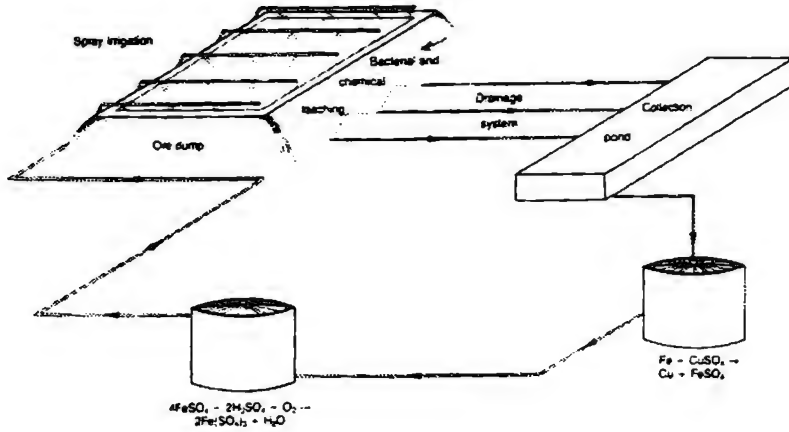
الخام، ونتيجة لذلك، تعمل هذه الوسائل على تقليل زمن دورة الترشيح، ويمكن أن يتم الترشيح بهذه الطريقة في غضون شهور بالمقارنة بالطريقة المتبعة في ترشيح المخلفات التي قد تستغرق سنوات.

والترشيح الراقودي، الذي تعالج فيه الخامات جيدة الصنف أو الركائز في خزانات مزودة بالهواء، يعتبر من أكثر الوسائل كفاءة حتى عن طرق الأكوام، ويمكن أن ينجز العمل في غضون أيام، وقد استخدمت طريقة الترشيح الراقودي بنجاح في تحليل (هلم) خامات بيريت الزرنيخ المحتوى على الذهب قبل استخلاص الذهب.

ويمكن أيضاً استخلاص ترسيبات الخام في مواقعها، دون الحاجة إلى إزالتها من المنجم، ويساعد ذلك على توفير تكلفة إحضار الخام إلى سطح الأرض، وقد يؤدي إلى التعدين الاقتصادي للترسيبات منخفضة المرتبة، وبعد أن يتم تكسير الخام بواسطة متفجرات موضوعة في أماكن مناسبة، يجري ضخ محلول الترشيح، بعد ذلك تجمع سوائل الترشيح الخصبة في آبار الاستخلاص وتضخ إلى السطح من أجل استخلاص المعدن، ويجري عادة إنتاج محاليل الترشيح على سطح المنجم بواسطة البكتيريا لأكسدة البيريت أو الخامات المناسبة الأخرى.

وهناك تطبيق آخر للاستخلاص في الموقع، وهو استخلاص المعادن من هالات الخام منخفضة الرتبة التي تبقى بعد استنفاد المنجم، ففي منجم ستا نروك بكندا، يجري غسل الأسقف والحوائط والأرضيات المستخدمة والجاري استخدامها بوسائل ترشيح على فترات كل ثلاثة أشهر، وينتج عن ذلك ماء غسيل حمضى، يحتوى على تركيزات كافية من اليورانيوم المذاب لاستخدامها في

استخلاص المعادن بطريقة مجدية اقتصادياً، كان يتم بهذه الطريقة الحصول على إنتاج من اليورانيوم يقدر بـ ٧,٥ طناً في الشهر.



شكل ٧-٣ يوضح الشكل مخطط لعملية استخلاص كومة من الخام لاستخلاص النحاس، وبعد رش محلول الاستخلاص على الخام يجرى جمع السائل المتغلغل في المادة ونقله إلى مصنع الترسيب حيث يجرى استخلاص النحاس، ويجرى بعد ذلك تجديد محلول الترشيح المستهلكة بواسطة البكتيريا المؤكسدة ويعد تشغيلها عن طريق الضخ.

تحسين وراثي لبكتيريا الاستخلاص Genetic improvement of leaching bacteria

على الرغم من أن طرق التعدين وتشغيل المعادن غير العضوية قد تكون لها الصفة السائدة في المستقبل القريب، إلا أن التنافس الاقتصادي على الغسل الحيوي لاستخلاص كميات كبيرة من النحاس واليورانيوم من الخامات منخفضة الرتبة قد وضحت جدواه، ويوجه الباحثون انتباههم حالياً نحو تحسين السلالات البكتيرية المستخدمة في الاستخلاص، وهو مجال آخر من مجالات الأبحاث الجارية التي قد تستفيد من مجيء تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، فالاستغلال الوراثي للبكتيريا قد يتيح في النهاية تطوير سلالات جديدة ذات معدلات نمو

تسرع، ويزيد من كفاءة عمليات الاستخلاص وتحسين مقاومتها للمعادن التي لها تأثيرات سامة على الكائنات العضوية. إلا أنه قبل أن يتم إنجاز أى من التحسينات ، ستكون هناك حاجة ماسة إلى معرفة الشيء الكثير عن الوراثة الجزيئية لبكتيريا *T. ferrooxidans* وأنواع البكتيريا الأخرى التي تسهم فى الاستخلاص الحيوى، فبالمقارنة بما يعرف ببكتيريا *E. coli* والعصية الرقيقة *Bacillus subtilis*، التي أجريت عليهما دراسات مستفيضة، تلك الأنواع البكتيرية التي لا تزال الهدف الرئيس لأبحاث الـ د. ن. أ. المطعم، فلا تزال المعلومات المتوفرة عن أعضاء جنس *T. ferrooxidans* معلومات متفرقة نسبياً.

وبكتيريا *T. ferrooxidans* هي هدف رئيس للتحسين الوراثي، بسبب دورها الرئيس في عمليات الاستخلاص الحيوى، بالرغم من أنه قد يكون ضرورياً أيضاً التبديل بأنواع أخرى من البكتيريا تسهم فى هذه العملية، ويتطلب تطوير نظام لتعديل المكون الوراثي لبكتيريا *T. ferrooxidans*، أو أى نوع بكتيرى لهذا الغرض خطوات عديدة ، أولاً، يجب التعرف على مميزات مناسبة، تستخدم كعلامات *markers* لتحديد واختيار السلالات البكتيرية التي تم تحويلها باكتساب مادة وراثية جديدة، ثانياً، يجب تحديد وتمييز متجه جزيئات د. ن. أ. يمكن استخدامه فى إدخال جينات جديدة إلى البكتيريا ، ثالثاً، يجب تطوير وسيلة لإدخال المتجهات فى سلالات *T. ferrooxidans* المستقبلية ، وأخيراً، يجب عزل الجينات التي تشفر عن الصفات المطلوبة وإدخالها فى جزيئات المتجه لنقلها إلى البكتيريا الجارى استغلالها .

وقد تم إجراء جميع هذه الخطوات مع بكتيريا أ.كولاي، بينما لا تزال الأبحاث المقارنة لبكتيريا T.ferrooxidans في مراحلها الأولى، وقد لا تكون الأساليب التي ثبتت فاعليتها مع بكتيريا أ.كولاي مناسبة مع بكتيريا الاستخلاص الحيوى، ففي الوقت الذى تستطيع بكتيريا T.ferrooxidans تحمل الأسس الهيدروجينية الحمضية، وتعتبر من الأنواع ذاتية الاغذاء، إذا لم تستخدم سوى ثانى أكسيد الكربون كمصدر وحيد للكربون، فإن أ.كولاي تحتاج إلى أس هيدروجينى متعادل تقريباً وهى غير ذاتية الاغذاء heterotroph أى أنها تحتاج على الأقل إلى مركبات عضوية بسيطة لتكفل معيشتها . وعلى الباحثين أن يبدأوا تقريباً من الصفر لاستتباط طرق للمعالجة الوراثية لبكتيريا T.ferrooxidans.

علامات اختيارية لبكتيريا ت.فيروكسيدان Selectable markers for T.ferrooxidans

لا توجد طريقة فعالة ١٠٠% لنقل جينات جديدة إلى الخلايا، وتعتبر وسيلة اختيار تلك الخلايا التى اكتسبت المادة الوراثية المنقولة وسيلة ضرورية، فالخلايا البكتيريا المنحولة مثل أ.كولاي قد تم تحديدها تماماً لاختيارها لخاصية مكتسبة جديدة، تكون مقاومة للتسمم من معدن ثقيل أو مضاد حيوى، أو تغيير فى المتطلبات الغذائية للخلايا.

واحتمال أيون المعدن يعد دليلاً جذاباً بصفة خاصة للدراسات الوراثية لبكتيريا T.ferrooxidans ، لأن لمقاومة المعدن المتزايدة إمكانية إضافة صفة مهمة صناعياً للبكتيريا، وعلى الرغم من أن بكتيريا T.ferrooxidans تقاوم

بصورة طبيعية التركيزات العالية لسلسلة كبيرة من المعادن الثقيلة، إلا أن معظم السلالات تتأثر بالزئبق والزرنيخ والفضة واليورانيوم، والموليبدنيوم، والتعرض لمثل هذه المعادن قد يقلل كفاءة البكتيريا، وعلى سبيل المثال، فقد يعاق استخلاص خامات بيريت الزرنيخ الحاملة للذهب أو الكتل المركزة بسبب إطلاق المركبات الزرنيخية السامة.

وقد تم التعرف على الجينات المشفرة عن المقاومة للزرنيخ والزرنيق في أنواع أخرى من البكتيريا، فإذا أمكن إدخال تلك الجينات إلى بكتيريا *T. ferrooxidans*، فإنها لا يمكن أن تستخدم فقط كعلامات مختارة لتحويل الكائن العضوى لكنها قد تحسن أيضاً من قدراته على الاستخلاص.

وقد كان يجرى استخدام الجينات المقاومة للمضاد الحيوى غالباً كعلامات مختارة، غير أن استخدامها مع بكتيريا *T. ferrooxidans* سيكون معقداً بسبب متطلبات النمو غير العادى للكائنات العضوية، فالأس الهيدروجينى المنخفض والتركيز العالى لأيونات معدن مثل الحديد فى وسط نمو بكتيريا *T. ferrooxidans* يجعل العديد من المضادات الحيوية غير ثابت، ويزداد تعقد الموقف بسبب النمو البطيء للبكتير، الذى يتطلب أن تظل المضادات الحيوية نشطة لفترة طويلة، ونتيجة لذلك، فقد يتضح أن بكتيريا *T. ferrooxidans* قد لا تكون مقاومة إلا لمضاد حيوى، حيث لا ينشط العامل المبيد للبكتير فى وجود الأس الهيدروجينى المنخفض والمحتوى العالى للحديد فى وسط النمو.

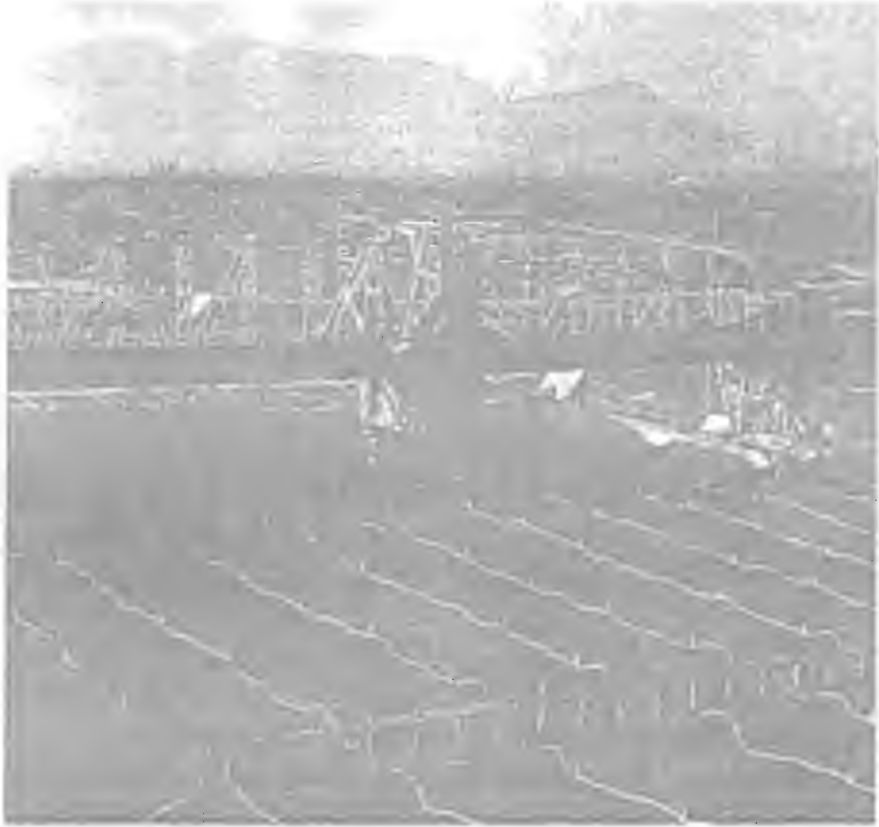
وعلى الرغم من أن بكتيريا *T. ferrooxidans* تتأثر بمضادات حيوية عديدة، تشتمل كلورامفينيكول chloramphenicol والأميسلين، فقد أتضح أنها تقاوم عدة مضادات حيوية أخرى، تشمل تتراسايكلين tetracycline

والإستربتوميسين streptomycin عندما تنمو فى ظروف طبيعية ، ومع ذلك، فقد اتضح أن المقاومة الظاهرية كانت بسبب خمود نشاط المضادات الحيوية، واحتمال وجود الحديد فى وسط النمو، وبتطوير وسط نمو لبكتيريا T.ferrooxidans خال من الحديد، وفى أس هيدروجينى ٤ بدلاً من الأس الهيدروجينى السابق الذى كان ما بين ١,٥ و ٢,٥، استطاع الباحثون أن يوضحوا أن الكائن العضوى كان يتأثر بالمضاد الحيوى التتراسيكلين، فالتغيير المناسب لظروف نمو، قد تمكن من التعرف على ما إذا كانت بكتيريا T.ferrooxidans مقاومة بالفعل لمضاد حيوى أم لا.

والطفرات الجينية التى تجعل البكتير يعتمد على إضافة أحد الأحماض الأمينية أو الفيتامين أو مادة غذائية أخرى إلى وسط المزرعة، لا يحتاج إليها نمو كائن عضوى من النوع البرى، قد أثبتت فائدة كبيرة طوال سنوات دراسة الوراثة الجزيئية، وقد تستخدم هذه السلالات الطافرة كأساس لاختيار نظام للمعالجة الوراثية، لأن إعادة إدخال نسخة سليمة من الجين الطافر، يخلص البكتيريا من الاعتماد على الغذاء، ومن ثم يجعلها تنمو فى غيابه، و حتى الآن على الأقل، لم يظهر أن بكتيريا T.ferrooxidans عرضة لاستراتيجية الاختيار هذه ، فلا يحتاج الكائن إلى أية مركبات عضوية لكي ينمو ، ولم تنتج معالجته حتى الآن بالعوامل المسببة للتحويل الخلقى مثل الأشعة فوق البنفسجية والمادة الكيميائية (NTG) أى طافر بهذا المطلب.

وقد أوضح أخيراً، جون كوكس John Cox من مؤسسة مارتك Martek Corporation فى كولومبيا بولاية مرييلاند، أن المعالجة بمادة (NTG) أعطت طافرات من البكتير T.ferrooxidans يفقد إلى بروتين rusticyanin ، وهو بروتين

يحتوى على النحاس، ويسهم فى تفاعلات تحول الإلكترون للبكتير، وتظهر النتيجة أن التبديل الخلقي mutagenesis التقليدى بالمواد الكيميائية، يجب أن يحفز الباحثين على المضى فى عزل طافرات مهمة أخرى.



شكل ٧-٤ منطقة استخلاص أولية فى منجم نحاس سوشيدودا مينرا بودا هويل فى سنشاجو بشيلي، وتصل أبعاد منطقة الاستخلاص نحو ٢٠ متر عرض و ٤٠ متر طول، ولها وتشان نقلان الخام وتاريخه، وصنعت أرضية المناطق التى تحتوى على طبقات يبلغ سمكها ٢.٤ مترا من الخلم المجروش من الخرسانة، وزيت يسـ hyponit أيضا ينظم صرف لجمع السوائل التى تسربت من الخام، ويسمى سقل الاستخلاص بـ raffinate (الناتج المنقى بالإذابة) وبعد تشغيله من مصنع استخراج المنقب، الذى يرسل معظم النحاس المستخلص من الدورة السابقة، ويحتوي raffinate على ٨ جم فى اللتر من حمض الكبريتيك، ومن ٠.٣ إلى ٠.٥ جم فى اللتر من متبقى النحاس، وخلال دورة الاستخلاص التى تستمر ١٨ يوما تستخدم دورة الاستخلاص الأولية بمعدل ٠.٨ لتر لكل دقيقة لكل متر مربع، ويستخلص الفصل الأولي ٩٠% من ثلث أكسيد النحاس و ٤٥% من كبريتيد النحاس، ويظل بعد ذلك الخام المستخلص من أماكنه، وينقل بالمقطورات إلى منطقة استخلاص ثانوية تبعد عن الأولى ١.٥ كم.



شكل ٧-٥ مناطق ترشيح ثقوية لمنجم نحاس موشودو ميترا بودهويل ، و يستمر غسل منطقة الاستخلاص التي يصل ارتفاعها ٦ متر لمدة ١٢٠ يوما، وأثناء تلك الفترة يجري رش الخام بمحلول الفسل بمعدل ٠.٠٥ لترا في الدقيقة لكل متر مسطح من الخام، ويستخلص الفسل الثقوي حوالي ٥٠% من النحاس المتبقى.

إنشاء متجه Vector construction

بالإضافة إلى محاولة إيجاد علامات اختيارية لبكتيريا *T. ferrooxidans* ، فقد بدأ الباحثون أيضا في استنباط متجهات Vectors لنقل جينات جديدة داخل ذلك الكائن، وقد ثبت أن البلازميدات plasmids التي هي عبارة عن قطع دائرية صغيرة من الـ د.ن.أ، تتضاعف بصورة مستقلة عن الكروموسوم البكتيري، أنها متجهات مفيدة جداً لنقل الجين إلى خلايا أ.كولاي. ويجب أن يكون أى متجه قادر على أن يتضاعف في الكائن العضوى الصناعى الذى يجرى استغلاله ، وسواء أكانت أية متجهات من بكتيريا أ.كولاي ستتجح مع بكتيريا *T. ferrooxidans* ، التى لها فسيولوجية مختلفة تماماً، فإن ذلك يثير حالياً مجالاً للجدل، ومع ذلك، فقد تم عزل بلازميدات من عدد من سلالات بكتيريا *T. ferrooxidans*، التى يمكن أن تستخدم كأساس لإنشاء متجهات لهذا البكتير.

وهناك شرط آخر لأى متجه، هو أن يكون لديه القدرة على التنقل بين العائل الصناعى وأحد العوائل الذى تم تشخيصها جيداً، مثل بكتيريا أ.كولاي أو البكتيريا العصوية الرقيقة، والتى عادة ما يستسخ منها الجين ، وهذا يعنى أن مصدر تضاعف المتجه ، وهى قطعة النكليوتيد التى تحتوى على الإشارات الأساسية لبدء تكاثر الـ د.ن.أ، لا بد إما أن تكون مخصصة للعمل فى كلا العائلين، أو يجب أن يحتوى المتجه على مصدر نسخ لكل من النوعين، وقد أحرز كل من دوجلاس رولنجز Douglas Rawling ودافىد وودز David Woods من جامعة كيب تاون بجنوب أفريقيا، بعض التقدم نحو تطوير متجه متنقل مناسب لبكتيريا *T. ferrooxidans*.

فقد قام كل منهما بصورة مستقلة باستنساخ أربعة بلازميدات من بكتير الاستخلاص الحيوى فى متجه بلازميد أ.كولاي، وكانت البلازميدات المطعمة التى تحمل أيضاً جينات لمقاومة الكلورامفينيكول والتتراسيكلين، قادرة على التضاعف فى أ.كولاي من مصدر نسخ يقع فى دن.أ بكتيريا *T.ferrooxidans*، ونجح أيضاً مصدر التكاثر لأحد بلازميدات بكتيريا *T.ferrooxidans* مع البكتير *Pseudomonas aeruginosa*، وبسبب سلسلة العائل العريضة من هذا التسلسل، فللبلازميد الذى يحتوى عليه إمكانية أن يكون متجهاً متنقلاً مفيداً جداً فى تجارب الاستغلال الوراثى المقبلة التى تتضمن لبكتيريا *T.ferrooxidans*.

وعلى الرغم من تكاثر بلازميدات *T.ferrooxidans* فى أ.كولاي، إلا أنه لا يبدو أن الجينات التى تحملها تُعبّر هناك، ولم يعرف حتى الآن سبب عدم تعبير الجينات فى أ.كولاي. وفى حدود التصور أن الآلية المخلفة للبروتين فى أ.كولاي، فشلت فى التعرف على إشارات التحكم فى جين البكتير الآخر، ووفقاً لأراء رولنجز وودز وزميلتهما أوجينا باروس، فإن جينات بلازميد *T.ferrooxidans* عبّرت فى خلاصة خالية من خلية أ.كولاي.

نظم نقل الجين لبكتيريا ت.فيروكسيدان Gene transfer systems for *T.ferrooxidans*

الطرق الثلاث التى تنقل بها الجينات إلى الخلايا البكتيرية هى: الانتقال العارض *transduction* والتحويل *transformation* والاقتران *conjugation*. ويعتمد الانتقال العارض على استخدام فى روس بكتيرى لتوصيل الـ دن.أ للخلايا التى يصيبها، ولما لم يكتشف فى روس حتى الآن لبكتيريا *T.ferrooxidans*، فمن غير الممكن فى الوقت الحاضر استخدام هذا الأسلوب.

وتشمل طريقة التحويل على الامتصاص البسيط للخلايا لـ د.ن.أ عارية. ومع ذلك ، يمكن تطبيق هذا الأسلوب مع سلسلة محدودة نسبياً من بكتيريا طبيعية، وقد تتغير الظروف المطلوبة لامتصاص الـ د.ن.أ بدرجة كبيرة من بكتير لآخر، وغالباً ما يتطلب إيجاد الظروف الحرجة للتحويل موهبة فى اكتشاف الأشياء، وحتى الآن لم تتجح الجهود الكبيرة لنقل خلايا العديد من سلالات بكتيريا T.ferrooxidans بينما لا تزال الجهود مستمرة.

وفى طريقة الاقتران ، ينتقل الـ د.ن.أ بصورة مباشرة من خلية بكتيرية لأخرى، ويتأثر الاقتران بوجود بلازميدات كبيرة تحتوى على أكثر من ٣٠ كيلو من قواعد الـ د.ن.أ، ولديها جينات ناقلة (tra) ، وبعض البلازميدات التى تحمل جينات tra، لا تستطيع أن تنقل إلا نفسها، ومع ذلك، فقد اكتشف الباحثون مجموعة من البلازميدات ذات سلاسل عائلة عريضة، لا يمكنها أن تنقل نفسها فقط، بل تستطيع أيضاً أن تساعد على نقل البلازميدات الأخرى التى لا تستطيع بنفسها أن تنتقل بين الخلايا البكتيرية ، ويعنى وجود بلازميدات ذات سلسلة عائل عريضة ، أن الاقتران هو الطريقة التى يمكن تطبيقها على نطاق واسع لنقل البلازميدات بين البكتيريا.

وحيث أن قدرة البلازميدات الذاتية على النقل لم يتم عزلها من T.ferrooxidans ، فقد بحث رولنجر وودز ما إذا كان يمكن تجديد بلازميدات T.ferrooxidans المطعمة المستسخة لتنتقل بين الخلايا البكتيرية بواسطة بلازميدات أخرى، وقد أوضحا حتى الآن أن بعض بلازميدات ذات سلسلة العائل العريضة، يمكن أن تجعل بلازميدات T.ferrooxidans المطعمة تتحرك مرات كثيرة بين سلالات خلايا مختلفة من أ.ك. 'ى، ومع ذلك، فلم يستطيعوا حتى الآن توضيح حركة البلازميدات المطعمة من أ.ك.ولاي

إلى *T. ferrooxidans*، ولا يعتبر هذا مثيراً للدهشة نظراً لمتطلبات النمو المختلفة تماماً لكلا النوعين من البكتيريا، وتتطلب طريقة الاقتران طاقة، ولم يكن من المستطاع حتى الآن، استنباط وسط، يمكن أن تتلاقى فيه مطالبيهما من الطاقة في نفس الوقت.

وتأتى الطريقة المناسبة لحل هذه المشكلة من استخدام نوع بكتيرى ثالث، ذلك النوع الذى يستطيع أن ينمو مع كلاً من بكتيريا أ. كولاى وبكتيريا *T. ferrooxidans*، ويعمل وسيطاً بينهما، والفكرة هى أن البلازميد سينتقل على مرحلتين، الأولى من أ. كولاى إلى الوسيط، وبعد ذلك من الوسيط إلى *T. ferrooxidans*. وهناك بعض الأنواع البكتيرية التى يمكن أن تؤدى دور الوسيط، مثل أنواع العصيات الكبريتية *Thiobacillus*، والتى تشمل على *T. novellus* و *T. intermedius*، والتى قد تعتبر وسائط مناسبة، فهى تستطيع أن تنمو مثل أ. كولاى، فى أس هيدروجينى متعادل، وفى وسط عضوى وأن تتحمل أيضاً ظروف الأس الهيدروجينى المنخفضة والوسط غير العضوى الذى تتطلبه بكتيريا *T. ferrooxidans*.

وقد تم تحقيق المرحلة الأولى لنقل البلازميد من أ. كولاى إلى *T. novellus*، ولا تزال المرحلة الثانية لنقل البلازميد إلى *T. ferrooxidans* محل الدراسة، وسوف تحتاج التجارب لشهور حتى تكتمل، حيث تنمو بكتيريا *T. ferrooxidans* بصورة بطيئة جداً، وفى تلك الأثناء، فإن قدرة بلازميدات *T. ferrooxidans* على أن تعبأ، متوقف على أن البكتير يحتوى على بلازميدات قدرة النقل الذاتى، وأن البحث عنها قد يستغرق بعض الوقت.

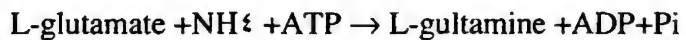
استنساخ وتعبير جينات T. ferrooxidans Cloning and expressing of T. ferrooxidans

إن استنساخ جينات T. ferrooxidans له بعض المميزات المحتملة، أولاً، سوف يتيح فرصة تحليل تركيب الجينات ووظائفها، وبالتالي يؤدي إلى فهم أفضل للبيولوجيا الجزيئية للبكتيريا، وثانياً، فقد توفر جينات يمكن استخدامها في التحسين الوراثي للـ T. ferrooxidans.

وتستمد معظم الجينات المتاحة حالياً لهذا الغرض، من أنواع لا تربطها صلة ببكتيريا T. ferrooxidans مثل بكتيريا أ.كولاي، وحتى الآن، لا يعرف الكثير من المعلومات المتعلقة بكيفية التحكم في تعبير الجينات داخل T. ferrooxidans، ولم يستطع الباحثون تحديد ما إذا كان يمكن تعبير جينات أ.كولاي في بكتيريا الاستخلاص، وباستخدام جينات T. ferrooxidans المستنسخة، سوف يجنب أية مشاكل تعبير قد تواجه جينات من أنواع أخرى.

وعلى الرغم من القدرة الهائلة لبكتيريا T. ferrooxidans على استخلاص النتروجين في صورة أمونيا، فإن ندرة النتروجين في سوائل الاستخلاص، قد يقلل من كفاءة هذا البكتيريا في استخلاص الخام، وعلى ذلك فإن تفاعلات تثبيت النتروجين وتمثيل الغذاء تعد من الأهداف الممكنة للتحسين الوراثي.

ويحفز إنزيم جلتامين سينساز glutamine synthetase أحد التفاعلات الرئيسية التي تمثل بها الأمونيا غذائياً:



ومنذ عهد قريب، استنسخ وونز ورولنجر جين *glnA* بكتيريا *T. ferrooxidans* فى بكتيريا أ.كولاي، الذى يشفر عن إنزيم جلتامين سينساز. وقد صنع إنزيم *T. ferrooxidans* لبكتيريا أ.كولاي بواسطة تعبير جيني بدأ بمعزز مادة حفازة من بكتيريا *T. ferrooxidans*. (والمعزز هو أحد التسلسلات المنظمة المطلوبة لبدء تعبير الجين)، و لا يعرف ما إذا كان هذا المعزز هو المعزز الطبيعي للتعبير عن جين *glnA* البكتيريا *T. ferrooxidans* أم لا، بيد أن التعبير عن الجين فى أ.كولاي، هو الدلالة الأولى على أن معزراً من بكتيريا ذاتى الاغذاء الإجبارى ، يعمل بصورة فعالة فى بكتيريا يعتمد فى تغذيته على عدة مصادر.

ويعيق النمو البطيء لبكتيريا *T. ferrooxidans* عملية عزل الإنزيمات وتمييزها ، والذى ينتج عنه حصيلة خلوية قليلة، وسوف يتغلب استنساخ جينات *T. ferrooxidans* وتعبيرها فى أ.كولاي على هذه المشاكل، وسوف يتيح الفرصة لإنتاج كميات كافية من الإنزيم من أجل تمييزه ، ويشابه إنزيم جلتامين سينساز الموجود فى بكتيريا *T. ferrooxidans* إنزيم أنواع البكتيريا الأخرى فى بعض النواحي على الأقل، فبروتين جلتامين سينساز النموذجي يتكون من ١٢ وحدة تحت رئيسة متطابقة، يحتوى كل منها على وزن جزيئى حوالى ٦٠٠٠٠، والبروتين الذى يشفر عنه بكتيريا جين *glnA* فى *T. ferrooxidans* له وزن جزيئى أيضاً حوالى ٦٠٠٠٠، وعلاوة على ذلك، ترتبط إنزيمات *T. ferrooxidans* وأ.كولاي بصورة مستضدية، إذ توحى بأن لهما تسلسلات أحماض أمينية متشابهة، بالرغم مما يبدو من أن التسلسلات النكليوتيدية للجينات المتناظرة غير متشابهة. وقد يحدث هذا لأن الشفرة الجينية

متننية؛ بمعنى أن بعض الأحماض الأمينية يتم تخصيصها في أكثر من كودون نكليوتيدى. وعندما يتحدد التسلسل النكليوتيدى لجين *glnA* فى *T. ferrooxidans*، يمكن أن يقارن بمثيله فى جينات *glnA* الأخرى، للتعرف على ما إذا كان بكتير الاستخلاص يظهر نمطاً مختلفاً من الاستخدام الكودونى.

والقدرة على تثبيت النتروجين مسألة مهمة بالنسبة لأى كائن عضوى يعيش فى بيئة تفتقر إلى ذلك النوع من الغذاء (انظر الفصل التاسع الذى يناقش موضوع تثبيت النتروجين)، وأوضحت مارى ماكنوتش من مؤسسة الأبحاث الميكروبولوجية فى بورتون داون بانجلترا، أنه كان عام ١٩٧٨ سلالة واحدة على الأقل من *T. ferrooxidans* يمكنها دمج النتروجين الجوى مع مادتها الخلوية، وعلى الرغم من أن الدراسات لم توضح قدرة البكتيريا على تثبيت النتروجين فى عمليات غسل أكوام الخام. ومع ذلك، توضح الدلائل أن تلك المقدرة موجودة بين سلالات *T. ferrooxidans*. ووفقاً لودز ورولنجز وIng-Martine Pretorius فى كيب تاون، فإن الد.ن.أ من خمس سلالات يحتوى على جينات *nifD* و *nifH* و *nifK*، التى تعتبر ثلاث من الجينات البنائية المطلوبة لتخليق آلية تثبيت النتروجين، وعلاوة على ذلك، فإن الجينات مرتبة على الد.ن.أ بنفس الترتيب الموجود فى بكتير *Klebsiella pneumoniae*، ذلك البكتير الذى يعد من النماذج الأولى لدراسات تثبيت النتروجين.

وتوحى الدلالة أيضاً على أن بكتير *T. ferrooxidans* يحتوى على جينات *ntxA* و *ntxB* و *ntxC*، وهى الجينات الثلاثة التى لها أدوار رئيسة فى تنظيم تثبيت النتروجين، بالإضافة إلى الأوجه العديدة الأخرى من أيض النتروجين البكتيرى،

ولا تزال هناك دراسات جارية، لتحديد ما إذا كانت تنظيم وتحكم جينات *nif* و *ntr* لبكتيريا *T. ferrooxidans* تشابه تنظيم وتحكم الجينات المماثلة في الأنواع البكتيرية الأخرى.

وتظهر فسيولوجية *T. ferrooxidans* تناقض مثير للاهتمام بالنسبة لمتطلبات طاقته وقدرته على تثبيت النتروجين، فعندما يحتاج هذا البكتيريا إلى الحصول على طاقته من أكسدة حديد الحديدوز، فيجب عليه استخدام الأكسجين كمتقبل نهائي للإلكترونات المزالة من أيون المعدن، وعلى الرغم من أنه غالباً ما يخمد نشاط بروتينات الـ *nif* بسرعة بسبب الأكسجين، فلا يمكن أن تعمل نظم تثبيت النتروجين إلا وهي محمية منه، وأوضحت السيدة ماكنوتش أن الـ *T. ferrooxidans* برغم ذلك، يمكنها أن تثبت النتروجين الجوى باستخدام حديد الحديدوز كمصدر للطاقة، وكان يجب توفير الأكسجين بتركيزات محدودة، تكفى للسماح بقدر من الأكسجين لأكسدة الحديد للمساعدة على تثبيت النتروجين، ولكن بقدر غير كاف لإخماد الإنزيمات المثبتة للنتروجين، ولا تزال هناك دراسات جارية لتوضيح الآلية التي يحل بها الـ *T. ferrooxidans* متطلباته المتناقضة ظاهرياً، من وجود الأكسجين لتوليد الطاقة، وغياب الأكسجين لتثبيت النتروجين.

ولا تزال هناك دراسات جارية عن الوراثة الجزيئية للأنواع الأخرى من جنس العصيات الكبريتية، وبالرغم من أن هذه الأبحاث في مرحلتها الأولى من التطور عن تلك الأبحاث التي أجريت على *T. ferrooxidans*، إلا أنها تعتبر الأساس لنظام وراثي للعديد من البكتيريا الموجودة، وكما ذكرنا من قبل، فقد أوضح الباحثون إمكانية النقل بطريقة الاقتران للبلازميدات بين أنواع أ.كولاي

والعصيات الكبريتية، التي تشمل على *T.novellus* ، بالإضافة إلى ذلك، استطاع
سول يانكوفسكى وزملاؤه فى جامعة تل أبيب، أن يعيدوا طفرات معينة من
T.thioparus إلى حالتها الطبيعية بتحويلها بواسطة د.ن.أ من بكتير نوع برى.
وفى النهاية، استخدمت آن سمرز ومشاركوها فى جامعة جورجيا فى
أثينا، الجينات الناقلة *transposons* لتخليق طافرات من *T.novellus*
و *T.versutus*. (الترانسبوزونات هى قطع من د.ن.أ، تستطيع إدخال نفسها فى
المادة الوراثية الخلوية. وإذا ما اعترضها جين، فتستطيع أن تدمر وظيفته)

الخلاصة

هناك قدر كبير من التقدم قد تحقق في تطوير أسلوب الاستغلال الوراثي لبكتيريا *T.ferrooxidans* على مدى السنوات القليلة الماضية، وقد تم عزل البلازميدات من ذلك البكتيريا، والتي قد تستخدم كمتجهات لنقل جينات جديدة إلى الخلايا البكتيرية، بالإضافة إلى ذلك، فقد اتضح أن جين *T.ferrooxidans* قد تم تعبيره في *أ.كولاي*، وهو دليل على أن تسلسلات التحكم الجيني لأحد الأنواع، يمكن التعرف عليها بواسطة تسلسلات التحكم الجيني لنوع آخر، ومع ذلك، فهناك احتياج إلى وسيلة لإدخال متجه د.ن.أ في خلايا *T.ferrooxidans*، بالرغم من أن بعض الخطوات قد تحققت في هذا الشأن.

وسوف ينتج عن تطبيق تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم والأساليب الوراثية المصاحبة في *T.ferrooxidans* والبكتيريا المشابهة لها، فهم أفضل للبيولوجيا الجزيئية للكائنات العضوية، وعلى سبيل المثال، سوف يتيح تولد طافرات جديدة فرصة الأبحاث في وراثته وتنظيم أكسدة الحديد والكبريت، ويمكن أن يكون لاختبار قدرة الـ *T.ferrooxidans* على استخدام حديد الحديدك، بدلاً من الأكسجين، كمتقبل للإلكترون عندما تختزل الأكسدة مركبات الكبريت، نتائج عملية مفيدة، وقد يحسن تعزيز هذه القدرة من أداء الـ *T.ferrooxidans* في عمليات الاستخلاص، عندما يكون الأكسجين غير متوفر بقدر كاف.

وإحدى مميزات تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، هي إمكانية استخدامها في إدخال نسخ متكررة من جين معين إلى الخلايا، وقد يتيح تكبير هذا الجين التعرف على الإنزيمات التي تعمل "كعق زجاجة" أيضاً، وسوف تقدم هذه

المعرفة فكرياً جديداً عن كيفية تحسين معدل نمو البكتيريا ودورها في الاستخلاص، وهناك تطبيق آخر محتمل لتكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم له أهمية عملية ويتعلق بتحسين مقاومة *T.ferrooxidans* لمعادن ثقيلة معينة والمعوقات الأيونية الأخرى الموجودة في بيئة الاستخلاص .

وهناك اعتبار مهم آخر يتعلق بتطوير السلالات المعدلة وراثياً من *T.ferrooxidans*، وهو توزيع الكائن العضوى الموجود في البيئة، حيث تميل كتلة خام معينة لأن تتوحد مع سلالة طبيعية تكيفت بطريقة خاصة للتعامل مع هذا الخام، فأى سلالة أخرى متغيرة وراثياً من مصدر آخر، قد لا تستطيع منافسة البكتيريا الموجودة، وقد من يكون من الضروري نتيجة لذلك، أن يستغل العزل المحلى وراثياً، من أجل إنتاج سلالة مناسبة لكتلة خام معينة.

الفصل الثامن

البكتيريا والبيئة

Bacteria and the environment

كما أوضحنا فى الفصول العديدة السابقة، أن الكائنات المجهرية تحظى بقدرات تخليقية وهدمية رائعة، والتي أصبحت بصورة متزايدة مهمة فى مجال التكنولوجيا الحيوية. وسوف تتطلب بعض التطبيقات التى يجرى تطويرها حاليا إطلاق الميكروبات فى البيئة. وتشمل هذه التطبيقات على استخدام البكتيريا أو الفيروسات فى مكافحة الآفات الحشرية. بالإضافة إلى ذلك، تستطيع البكتيريا هدم المخلفات والمواد السامة، ولذا فلديها القدرة على تنظيف السوائل الكيميائية وصور التلوث الأخرى. وتوجد تطبيقات للبكتيريا حتى فى مجال التعدين، حيث تستطيع بعض الكائنات العضوية أن تستخلص المعادن المهمة من الخامات منخفضة المرتبة، والتي يكون استخلاصها بالطرق العادية غير مجد اقتصاديا.

والعديد من الكائنات المجهرية المستخدمة فى هذه التطبيقات يجرى تعديلها وراثيا بواسطة طرق الـ د.ن.أ. المطعم. وعلى سبيل المثال، يمكن إكساب البكتيريا قدرات هدم كيميائية جديدة، عن طريق إدخال جينات لتلك الكائنات المجهرية من أجل تخليق الإنزيمات التى تقوم بتحفيز التفاعلات المطلوبة. ويثير أى إطلاق متأن لكائن عضويا فى بيئة جديدة ردود فعل، فيما إذا كان إطلاق هذا الكائن سيحدث أضرارا بيئية، بينما تتطلب الإطلاقات المقترحة للميكروبات المعدلة وراثيا تقييم واعى بشكل خاص.

تحتوى البيئات الطبيعية على سكانها الطبيعيين من الكائنات المجهرية، التى تشمل على البكتيريا والخميرة والفطريات. وعلاوة على ذلك، تلعب هذه

الميكروبات دورا هاما فى دورة الكربون، حيث تقوم بهدم النباتات الميتة والمادة العضوية وإطلاق ثانى أكسيد الكربون والمواد الغذائية الأخرى التى يستطيع النبات استخدامها فى تخليق مواد عضوية جديدة. وتعتبر الكائنات المجهرية التى تعيش فى التربة مهمة أيضا فى الإسهام فى دورة النتروجين. وتقوم هذه الكائنات المجهرية من بين مهام أخرى بتثبيت النتروجين، حيث تستمد النتروجين الخامل من الجو وتحوله إلى صور يحتاج إليها النبات.

وقد يؤدى إطلاق الكائنات العضوية المعدلة وراثيا إلى قلقلة ذلك النسيج الرقيق للطبيعة، أو يحتمل أن يؤدى إلى ظهور كائنات لها ليست لديها الفاعلية لمقاومة الحشرات أو يكون لها آثار ضارة على الحيوان والنبات، وخاصة المحاصيل النباتية. وعلى ذلك، فالسمة الأساسية لتلك الإطلاقات المقترحة يجب أن تتضمن تقييم واع للتأثير الذى قد تحدثه هذه الميكروبات على البيئة وصحة الإنسان.

إنتاج عوامل لمكافحة الآفات الميكروبية

Agents for microbial pest control

خلال العقود العديدة الماضية، أنقذ استخدام المواد الكيميائية العضوية التخليقية فى صورة منظومة عريضة من مبيدات الحشرات حياة الملايين من الأرواح وإلا فكانت ستموت بسبب الأمراض المتوطنة فى حشرات، مثل الملاريا. وقد أسهمت المواد الكيميائية أيضا فى الزيادة الكبيرة فى إنتاجية المزارع التى كانت موجودة فى تلك الفترة. ومع ذلك، فقد كان ثمن هذا التحسن فى نوعية الحياة فادحا، و يتضح أثره إلا خلال العقدين الماضيين.

أصبحت المخلفات السامة التى نجمت عن تلك المبيدات الحشرية التخليقية ملوثات بيئية ذات تأثيرات ضارة على الحياة البرية، التى اشتملت على الطيور

وبعض الحشرات المفيدة من النحل ، ومن الممكن تصور أيضا أنها ألحقت ضررا بصحة الإنسان ، وعلاوة على ذلك ، فقد شجع الاستخدام المستمر لبعض تمبيدات الحشرية على ظهور بعض الأنواع من الآفات اكتسبت مقاومة ، ولم تعد تفلح معها المواد الكيميائية . وعلى سبيل المثال ، أصبح البعوض الحامل لمرض الملاريا فى أجزاء عديدة من العالم مقاوما للمبيد الحشرى من مادة DDT (dichlorodiphenyl trichloroethmer) ، التى ظلت لسنوات المادة المفضلة للقضاء على هذه الآفة .

وبسبب تلك المشاكل المتعلقة بالآثار السامة والآفات المقاومة ، فقد حظر إنتاج العديد من المبيدات الحشرية فى الولايات المتحدة ، أو استخدم فى بعض الحالات الضرورية بعد مراجعة حكومية صارمة . وينطبق الإجراء الأخير على مبيدات الآفات دائمة المعالجة بالكور ، مثل مادة هيبتا كلور heptachlor التى كانت تستخدم فى التخلص من النمل الأبيض الموجود أسفل أساسات المباني .

ولهذه الأسباب وأسباب أخرى اهتمت الجهات الحكومية والأكاديمية وعلماء الصناعة لفترة من الزمن بالبحث عن وسيلة لمكافحة الآفات بواسطة عوامل بيولوجية وطبيعية ، ويمكن القيام بهذا بوحدة من الطرق العديدة ، ومن بينها إطلاق ذكور حشرات عقيمة للتزاوج بدون تناسل مع إناث أنواع من الآفات ، واستخدام الفيرومونات^(١) pheromones لإفساد نظام الحشرة الغذائى أو سلوكها التناسلى .

(١) الفيرومون : مادة كيميائية يفرزها الحيوان ، يكون لها تأثير محدد على عضو آخر من نفس النوع مثل التزاوج أو الهجوم ، وتوجد الفيرومونات فى الحشرات ، وتوجد أيضا فى القوارص ، والقروذ . (المترجم) .

وهناك مجال بحثى آخر يظهر أن له دلائل واعدة كبيرة فى مكافحة البيولوجية للآفات ، هو استخدام الكائنات المجهرية التى لديها قدرات طبيعية على إنتاج السموم ، وخصوصا تلك التى تقتل حشرات معينة ، وتعد مكافحة الميكروبية فى الحشرات من الاهتمامات الجذابة ، لأن الميكروبات بصفة عامة سلسلة عوائل محدودة تماما ، ونتيجة لذلك ، فإنها لا تؤثر إلا على أنواع معينة من الحشرات فى موقع معين دون أن تحدث تميرا شاملا للحشرات المفيدة وكذلك الحشرات الضارة ، وعلاوة على ذلك ، فمن خلال الحالات التى تم دراستها حتى الآن ، فإن تطوير مقاومة الحشرات الممرضة يحدث على فترات قصيرة أقل من تطوير مقاومة للمبيدات الحشرية الكيميائية التخليقية ، وفى النهاية ، أن يحدث تكون للمخلفات السامة فى البيئة .

عصية ثرنجسيس

Bacillus thuringensis

هناك ما يزيد على ١٥٠٠ عامل أو منتج مكافحة بيولوجى ، ربما يكون لها إمكانية التطور التجارى ، اثنان من أكثر العوامل التى أجريت عليهما دراسات مكثفة واختبرا فى الحقل هما : عصية ثرنجسيس Bacillus thuringensis والفيروسات من عائلة Baculoviridae .

وعلى مدى الثلاثين عاما التى استخدم فيها البكتير Bacillus thuringensis فى مكافحة البيولوجية للآفات ، ظهر أن هناك ثلاثين نوعا مختلفا لها نشاط مبيد للآفات ضد ما يزيد على مائة نوع من الحشرات من الرتب البيولوجية لحرشفيات الأجنحة^(٢) Lepidoptera وذوات الجناحين Diptera^٣ . وتشمل الرتبة

(٢) حرشفيات الأجنحة : رتبة الفراش من الحشرات . من فصائلها الفراشيات والدوديات والزحليات والذارعات والقائلات إلخ .

تأخيرة كل البعوض المتغذى بالترشيح تقريبا والذبابة السوداء. وأصبح استخدام *Bacillus thuringensis* في مقاومة البعوض من التطبيقات القياسية، وتنتج شركات في الولايات المتحدة والصين وإسرائيل والهند ونيجيريا كميات كبيرة من هذا الكائن العضوى على المستوى التجارى .

ويعد استخدام هذا الميكروب بسيطا نسبيا، لأنه يكون بوغات يمكن أن تنتشر في خليط الماء، وتطبق في الأماكن المطلوب معالجتها. وعند فحص البوغات ذات المظهر البلورى تحت الميكروسكوب، تظهر أنها تحتوى على سموم بروتينية. وعندما تتغذى يرقات الحشرة على بلورات البوغات، تطلق سم يسمى δ -endotoxin، يعمل على تدمير أغشية الخلايا المبطنة لجدار معدة اليرقة. ومفعول السم سريع جدا، حيث تمر يرقات البعوض بعد هضم بلورات البوغ في غضون دقائق.

وقد أجريت العديد من التجارب الحقلية على *acillus thuringensis*، وأظهرت أنها تسبب نقص هائل في أعداد يرقات البعوض. ومع ذلك، فالتطبيقات المتكررة مطلوبة بصفة عامة لمقاومة نشاط اليرقات الآفة. وقد يمكن التغلب على هذه المشكلة باستخدام أساليب الـ د.ن.أ المطعم لنقل جينات *Bacillus thuringensis* السامة إلى كائنات مجهرية أخرى لها قدرة أفضل على مقاومة ما يشكل بيئات معادية، مثل البحيرات التى يعيش فوقها البعوض. وقد استسخ جين δ -endotoxin في البكتير أ.كولاي. بالإضافة إلى ذلك، استسخ تيرى جراهام وليديا واترد من مؤسسة مونسانتو في سانت لويس بولاية ميسورى هذا الجين فى بكتير *Pseudomonas fluorescens* الذى يعيش على جذور - النباتات.

وتقوم وكالة حماية البيئة الأمريكية EPA بمراجعة التطبيقات لإجراء التجارب الحقلية على هذه الكائنات المجهرية المهندسة وراثيا. وقد ووفق على الكائن العضوي *B.thuringensis* بشكل عام على أنه الكائن العضوى الأكثر أمانا حتى

الآن، الذى يطور من أجل مكافحة اليرقات البعوضية. وسواء كانت مبيدات الآفات الميكروبية المهندسة وراثيا مبيدات آمنة وفعالة، فإن ذلك من المسائل التى ستخضع للدراسة المكثفة.

الفيروس العصى

Baculovirus

وهناك عددا من الفيروسات لها أيضا القدرة على العدوى وتفتك بأنواع معينة من الآفات الحشرية، إما يجرى استخدامها، أو تم وضعها فى الاعتبار لكى تستخدم كعوامل مكافحة بيولوجية. ومن بين هذه الفيروسات، الفيروسات التى تنتمى لعائلة Baculoviridae ، والتى تعتبر ذات فاعلية شديدة فى مكافحة بعض الآفات مثل دودة حب القطن وفراشة Douglas fir tussock والقزحية الإسفنجية.

والفيروسات العصوية مثل B.thuringiensis ، لا تصيب إلا أنواعا معينة من الحشرات، وهى نشطة جدا كمبيدات حشرية. بالإضافة إلى ذلك، يمكن استخدام هذه الفيروسات بسهولة ولها فترة تخزين shelf-life طويلة.

وتستخدم الجزيئات الفيروسية عادة فى مخلوط أساسه مائى وترش على أوراق النبات المطلوب حمايتها، وعندما تأكل الحشرات أوراق النبات المحتوية على الفيروس، فإن الجزيئات الفيروسية تصيب جدار المعدة. ويتناسل الفيروس هناك وينتشر بعد ذلك فى أجزاء النسيج الأخرى، ومن ثم يحدث العدوى لأجهزة الحشرة ويفتك بها . ويمكن أن تنتشر جثة الحشرة المنقلة بالجزيئات الفيروسية الحية فى حشرات أخرى.

وأظهرت الدراسات التى أجريت على B.thrungiensis والعوامل البيولوجية الأخرى إمكانية القضاء على العديد من الآفات الحشرية. وقد تتحسن الجدوى الاقتصادية للمكافحة البيولوجية فى حالة ما تستخدم الهندسة الوراثية فى إنتاج

عوامل ميكروبية أو فيروسية، تعزز المقاومة للضغوط الطبيعية التي ستظهر في تحقل. وتشمل هذه الضغوط التعرض للجفاف والحرارة والبرد والأشعة فوق البنفسجية القادمة من الشمس. بالإضافة إلى ذلك، سوف تجعل المعالجة الوراثية التي توسعت في سلسلة حاضنات من عوامل مكافحة الميكروبية أكثر جانبية من وجهة النظر التجارية.

وتهتم الأبحاث الجارية أيضا بإنتاج عوامل مقاومة أكثر اقتصادا وتقى بمطالبات التنظيمات الحكومية المتعلقة بالتأثير المحتمل لإطلاق العوامل في البيئة. ونتائج الدراسات المكثفة لتقييم مخاطر إطلاق الكائنات المهندسة وراثيا في الحقل وشبكة الصدور. والهدف من ذلك هو الحفاظ على الفوائد التي تم الحصول عليها من خلال سلسلة مبيدات الآفات العضوية، وفي نفس الوقت تقليل أو تزيل ترسب المخلفات السامة والمشاكل البيئية المحتملة الأخرى .

الاستخدامات الزراعية للكائنات العضوية المعدلة وراثيا

Agricultural uses of genetically altered organisms

أظهرت تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم آمالا عظيمة في التطبيقات الزراعية الأخرى، بالإضافة إلى إنتاج مبيدات الآفات والبكتيريا المهندسة وراثيا. وتتضمن أحد المنتجات الأخيرة، استخدام ميكروبا مهندسا وراثيا لحماية المحاصيل النباتية ضد ضرر الصقيع.

ويعيش البكتير الشائع *Pseudomonas syringae* على سطوح العديد من الأنواع النباتية، ويحتوى على بروتين فى غشاء خلية، يجعل الماء يكون بلورات ثلجية عند درجة حرارة عالية نسبيا تصل ما بين صفر و ٢ درجة مئوية، ولذلك يسبب للنبات ضرر الصقيع . وفى غياب هذه العوامل المنوية للثلج، لا تظهر على

النباتات أضرار الصقيع إلا عندما تصل درجة الحرارة ما بين ٨ و ٢ درجات مئوية تحت الصفر.

وباستخدام أساليب الهندسة الوراثية، استطاع ستيفن لندو وزملاؤه في جامعة كاليفورنيا في باركلي أن يزيل الجين المشفر عن البروتين المنوي للتلج من كروموسوم البكتير *Pseudomonas syringae*. والمتوقع من هذا، هو أنه عند رش النبات أو البنور بالبكتير المهندس وراثيا والمنزوع منه الجين المسبب للصقيع، سيجعل هذا البكتير يستعمر سطوح النباتات قبل أن تستعمرها السلالات الطبيعية المسببة للصقيع، وبالتالي يجعل النباتات مقاومة بدرجة أكبر للصقيع.

وتوجد أيضا العوازل الطبيعية من بكتير *Pseudomonas syringae* المفتقرة بصورة طبيعية إلى الجين الذي ينتج البروتين المنوي للتلج، كطافرات سلبية للتلج، والتي أنتجت في المعمل بطرق تقليدية دون الاستعانة بتكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم. وقد تستخدم هذه البكتيريا بنفس الطريقة التي تستخدم بها الأنواع المهندسة وراثيا. ومع ذلك، لما كانت التغيرات الدقيقة التي حدثت لم تعرف إلا للبكتيريا التي نتجت من تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، فيعتقد أن يكون لهذه السلالات الخطر الأقل المصاحب لإطلاقها في البيئة.

وسوف تجرى مجموعة باركلي وعلماء من وكالة حماية البيئة الأمريكية تجارب حقلية على سلالات من البكتير *Pseudomonas syringae* المهندس وراثيا السالب الصقيع في موقع في شمال كاليفورنيا في ظل ظروف تجريبية محكمة الدقة. وتهدف التجربة إلى تقييم فعالية البكتير في جعل النبات أكثر مقاومة للصقيع، وتأثيراته البيئية المحتملة، وإجراءات مراقبة البكتير بعد إطلاقه.

ولا تقتصر تطبيقات تكنولوجيا الـ د.ن.

تراقية. وهناك مجال مثير بصفة خاصة فى الأبحاث الزراعية، يتضمن معالجة الوراثة للمحاصيل النباتية(أنظر الفصل الحادى عشر). وبدأ الباحثون من خلال إدخال جينات جديدة إلى النباتات تطوير سلالات محسنة تقاوم بكتيريا الحاملة للأمراض، والفيروسات، ومبيدات الحشائش.

دورة الكربون التى تقوم بها الكائنات المجهرية

Carbon-cycling by microorganism

دون تكرار دوران الأنشطة التى تقوم بها البكتيريا والخميرة والفطريات، فيمكن لعناصر مهمة بيولوجيا مثل الكربون والنيتروجين والكبريت أن تتوقف تماما داخل المادة العضوية. فتصور ما يحدث على سبيل المثال، إن لم تقم الكائنات المجهرية بهدم المادة العضوية فى الأوراق المتساقطة فى فصل الخريف من كل عام، وتترك هذه الأوراق تتساقط على أرض الغابة إلى الأبد. وللميكروبات مواهب متعددة لا متناهية من خلال التفاعلات التى يمكن أن تقوم بها فى هدم المركبات العضوية. فالمسارات الإنزيمية التى نشأت منذ ملايين السنين تتيح للكائنات المجهرية استخدام سلسلة كبيرة من المركبات التى تمدّها بالطاقة والوحدات البنائية التى تحتاجها لتخليق المكونات الخلوية. وأظهرت الدراسات التى أجريت على المسارات الإنزيمية بصفة عامة، أن المركبات ذات التركيبات الكيميائية المتشابهة وحدات بنائية خلوية، تشمل على الأحماض الأمينية والسكريات، تقوم على هدمها مسارات إنزيمية أقصر من المسارات الإنزيمية المطلوبة لهدم المركبات الأكثر تعقداً، والتى غالبا ما تتطلب خطوات عديدة لإكمال عملية هدم المواد العضوية.

مصادر المركبات التخليقية فى الطبيعة Sources of synthetic compounds in nature

تعرضت الكائنات المجهرية طوال العقود العديدة الأخيرة لآلاف من المركبات العضوية الجديدة التى صنعها الإنسان. وقد استخدمت هذه المركبات التى تتحدى حتى القدرات الهدمية المتعددة للميكروبات فى الزراعة والصناعة والمخلفات الأدمية. وقد ترش هذه المركبات إما على غير توقع أو تلقى بكميات كبيرة بطريقة متأنية . وتنقسم المواد الكيميائية إلى فئات مختلفة، تشمل مبيدات الفطريات ومبيدات الآفات ، والملدنات، والمذيبات، والمنظفات، ومثبطات اللمب والمبردات وأعدادها آخذة فى التزايد.

وتقوم الطائفة الميكروبية بهدم بعض من هذه المركبات العضوية التخليقية، ولا تشكل أية تهديدات بيئية. وتتحلل هذه المركبات التخليقية لأنها مشابهة للمركبات الطبيعية، ونتيجة لذلك يمكن أن تؤثر عليها الإنزيمات الميكروبية السابقة الوجود. ومع ذلك، توجد مجموعة أخرى من المركبات التخليقية أقل تأثراً بالهجوم الميكروبي وتندوم لفترات طويلة فى الطبيعة. وعلى ذلك، فهذه العوامل إمكانية إحداث مشاكل تلوث خطيرة.

فحتى المركبات التى تحللت بالفعل فى بعض الظروف البيئية، تدوم لفترة طويلة فى أماكن أخرى. وعلى سبيل المثال، يختفى عادة المبيد الحشرى السام باراثيون parathion من التربة فى غضون شهر من استخدامه، بينما يظل هذا المبيد فى ظروف ملائمة لأكثر من ستة عشر عاماً من بعد آخر مرة استخدم فيها . وقد يعكس هذا الدوام الطويل للمبيد غياب الميكروبات الهادمة الأساسية من التربة، كنتيجة لغياب بعض الظروف الكيميائية الحيوية أو البيئية التى تؤخر نموها.

الأيض ١ الميكروبي للمركبات المهلجنة

Microbial metabolism of halogenated compounds

المركبات التحليلية المحتوية على الهالوجينات (عناصر البروم أو الكلور أو الفلور أو اليود) هى السبب فى التلوث السام فى عدة مواقع نفايات خطرة . ولا تستطيع الكائنات المجهرية أن تهدم العديد من هذه المركبات المستخدمة على نطاق واسع . وتنتمى مادة DDT إلى هذه الفئة ، وعلى الرغم من تناقص استخدامها بدرجة كبيرة منذ عام ١٩٧٥ ، فلا تزال توجد فى التربة فى عديد من المناطق . ومادة الـ Polychlorinated biphenyls والتي تختصر إلى (PCBs) ، والمستخدم كمادة عازلة فى الأجهزة الكهربائية ، ومذيب التنظيف الجاف الكربوني تتراكمorida tetrachloride ، يعتبران أيضا من أشهر المركبات العضوية المهلجنة .

إلا أن وجود المركبات الهالو - عضوية ، ليست غلطة مسئول عنها الإنسان وحده . فقد تم التعرف على ما يزيد عن ٢٠٠ منتج طبيعى مهلجن . ويحتوى حوالى ٧٥% من هذه المركبات على الكلور ، وقد نشأ العديد منها فى مياه المحيطات المالحة . ووجود هذه المركبات الكيميائية الطبيعية المهلجنة هو دليل على أنه قد تكون للكائنات المجهرية إنزيمات لهدم هذه المركبات - وقد تستخدم قدرات هذه الكائنات المجهرية فى مكافحة التلوث البيئى الناجم من المواد الكيميائية التى صنعها الإنسان بنفسه .

وبصفة عامة ، هناك نوعان من الهدم الميكروبي . الأول ، تتحلل المركبات للمساعدة على نمو كائن عضوى وإمداده بالمواد الغذائية الأساسية ، مثل الكربون والنتروجين أو الكبريت . والثانى من الأبيض ، الذى يعرف بالأبيض المختلط cometabolism ، لا تستخدم المركبات فى المساعدة على نمو الكائن العضوى، ولا تستخدم كمصادر غذائية ، والأبيض المختلط بصفة عامة النتيجة التصادفية للنقص المطلق لتخصص الركيزة من قبل الإنزيمات الميكروبية . وهناك مركبات غير

(١) الأيض (عن مجمع مصر ، وقد شاعت عند أساتذة النبات ، وفى اللسان عن الليث : هو صيرورة الشيء شيئا غيره ، وهى أصلح من التحول المستعملة لمعان أخرى والإنجليزية من اليونانية بمعنى الأيض أى التحول والتبدل جملة التبدلات فى المادة والقوة التى تحصل فى التعضيات منذ ولادتها حتى موتها ، ويكاد الأيض يكون مرادفا لوظائف التغذية وله طوران أو اتجاهان: إيجابى ويسمى الأيض البنائى anabolism وسلى ويسمى الأيض الهدمى catabolism معجم المصطلحات الزراعية للشهاى ١٩٨٨ ، المترجم .

طبيعية معينة، مثل المواد الكيميائية الهالو-عضوية قد تشبه ركيزة الإنزيم الطبيعية بصورة فعالة في القيام بنفس التفاعل الإنزيمي. والمركبات التى لا تشابه أى من المواد الخام الطبيعية، ستكون مقاومة للهدم الميكروبي، إلا إذا تغيرت بواسطة الضوء أو الماء أو العوامل البيئية، بطريقة تجعلها خاضعة للإنزيمات الميكروبية.

تحسين الهدم الميكروبي بواسطة الهندسة الوراثية Improving microbial degradation by genetic engineering

على الرغم من قيام الباحثون بعزل الكائنات المجهرية التى يمكنها هدم المركبات العضوية المهلجنة، إلا أنه غالبا ما يكون للميكروبات نشاطا محدودا. وعلى سبيل المثال، فقد تم التعرف على سلالة من الزوائف *Pseudomonas* التى يمكنها هدم حمض ٢-chlorobenzoic، بينما لا تستطيع هدم مركبات-chloro-؛ وأحماض ٢,٥-dichlorobenzoic ذات الصلة الوثيقة به.

وهناك سلالة أخرى من *Pseudomonas* يمكنها هدم حمض-٢,٤,٥-diclorophenoxyacetic، لكنها لا تستطيع التأثير على حمض-٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic الذى يختلف عن الحمض السابق فى أنه يحمل نرة كلور ثالثة فى الجزيء. وقد استخدم كلا من هذين المركبين على نطاق واسع كمبيدات للحشائش، وظل المبيد ٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic موجود فى البيئة.

وتطبيق الطرق الوراثية الجديدة فى إنشاء سلالات ميكروبية حديثة ذات قدرات محسنة لهدم المركبات التخليقية العديدة، يعد من مجالات البحث الجارية. وعلى الرغم من ذلك، فقبل التمكن من إنشاء مثل هذه السلالات، يجب على الباحث أن يجيب عن سؤال "لماذا لا تتهدم المواد الكيميائية السامة بصورة طبيعية؟ والإجابة عن هذا السؤال، يتطلب معرفة مفصلة عن المسارات التى

تهدم المركبات المرتبطة بصورة تركيبية، والتي تتضمن على فهم نوعيات الإنزيمات وتنظيمها.

وقد لا تستطيع الميكروبات القيام بهدم كامل لمركب معين لعدة أسباب. فقد لا يكون لدى الكائنات كل الإنزيمات المطلوبة للهدم، أو قد تكون موجودة لكنها بطيئة التأثير تماما. ويمكن حل هذه المسائل عن طريق إدخال جينات جديدة في الكائن العضوى بمكنها أن تشفر عن الإنزيمات ذات التخصصات المرغوبة. وهناك اختيار آخر، وهو إدخال الطافرات في جين مناسب داخل الميكروب من أجل تغيير تخصصية الإنزيم، لتتيح له فرصة التعرف على الركيزة المرغوبة. وإذا كانت المشكلة تنحصر في بطيء المسار الهدمى، فقد يكون الحل هو زيادة مقدار الإنزيمات المنتجة عن طريق استنساخ الجينات المماثلة فى بلازميد، يكون موجود بنسخ متكررة داخل الخلية.

وهناك تفسير آخر محتمل للقصور في هدم مادة كيميائية، هو الفشل فى الوصول إلى الخلية الميكروبية. وقد يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق إدخال طفرات جينية إلى نظام ناقل موجود لزيادة سلسلة تخصصه لكى تشمل على المادة الكيميائية المطلوب هدمها. وأخيرا، فقد ينظم تخليق الإنزيمات الهادمة بطريقة محكمة بحيث يتوقف نشاطها بصورة طبيعية ولا تنشطها المادة الكيميائية الجارى هدمها. وفى هذه الحالة، سيكون الحل هو اختيار الطافرات النظامية التى تنتج الإنزيمات المرغوبة دون الحاجة إلى تنشيط معين للجينات. وهناك طرق متوفرة للقيام بكل هذه المعالجات التى ذكرناها سابقا.

وقد بين والتر رينكى وهانز ناكمس من جامعة Gesamthochschule فى وبرتال بألمانيا، أن من الممكن إنشاء مسارات كاملة للهدم الكيميائى، عن طريق ضم القدرات الوراثية لسلسلتين بكتيريتين. وتحمل الجينات المطلوبة لإجراء هدم

المواد الكيميائية التخليقية بصورة طبيعية على بلازميدات، بدلا من حملها فى د.ن.أ. كروموسومى. وعلى سبيل المثال، فالجينات التى تسمح للسلسلة المذكورة سابقا من *Pseudomonas* التى تهضم حمض ٣-chlorobenzoic بدلا من ٤-chloro-، أو أحماض ٣,٥-dichlorobenzoic واقعة على بلازميد.

ويمكن أن تنتقل البلازميدات بسهولة بين أنواع *Pseudomonas*. واستطاع رينكى وناكس أن يدخل بلازميد ثان يسمى بلازميد TOL، فى سلالة *Pseudomonas* لديها المقدرة على هضم حمض ٣-chlorobenzoic، من أنواع *Pseudomonas* أخرى. ويحمل بلازميد TOL جينات تشفر عن إنزيمات تسمح بتحويل أحماض ٣-chloro- و ٤-chloro- و ٣,٥-dichlorobenzoic إلى الكاتكولات catechols المهلجنة المناظرة. ويستطيع البكتير الناتج أن يهدم تماما كلا من الحمضين البنزويكيين أحاديا الهلجنة (شكل ٨-١).

وبتربية هذه السلالة فى وجود حمض ٣,٥-dichlorobenzoic، سمحت حينئذ بعزل طافر يمكن أن يهدم كل أحماض البنزويك الثلاثة. ولا تتطلب هذه المعالجة استخدام أساليب الد.ن.أ. المطعم بشكل عرضي، لكنها أظهرت أنه يمكن استغلال الإجراءات الوراثة البسيطة فى تطوير سلالات بكتيرية جديدة من خلال تطور اضطرارى.

وباستخدام إجراء مختلف، استطاعت أنادا شاكرا برتى وزملاؤها فى المركز الطبى بجامعة شيكاغو فى ولاية شيكاغو أن يعزلوا سلالة من *Pseudomonas cepacia* تستطيع أن تهضم ٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic acid. وتعتبر تركيبات الد.ن.أ. لبعض البلازميدات الموجودة بصورة طبيعية والتى تسهم فى هضم

* الكاتكول: أحد المشتقات البلورية اللاونية من البنزين، التى تستخدم أساسا فى التصوير والمصباغة، كمادة كاشفة، ويسمى أيضا بيروكاتكول. المترجم

مركبات العطرية متشابهة تماما، ذلك الاكتشاف الذى يوحى بأن البلازميدات مرتبطة بشكل تطورى. والافتراض الحالى بأن البلازميدات ذات الوظائف الوراثية الجديدة ربما تكون قد نشأت من أصل مشترك بطرق غير مفهومة، ولكن من المحتمل أن تكون قد اشتملت على تطعيمات بين الجينات البلازميدية وجينات الإلغاء والطفرات. ونتيجة لذلك، فبإضافة بلازميدات جديدة لتلك البلازميدات الموجودة بالفعل فى البكتريا الأصلية النشأة فى التربة الملوثة، قد يعطى تجمّع جينى مناسب لنشوء جينات جديدة، يستطيع أن يهدم الملوثات الكيميائية.

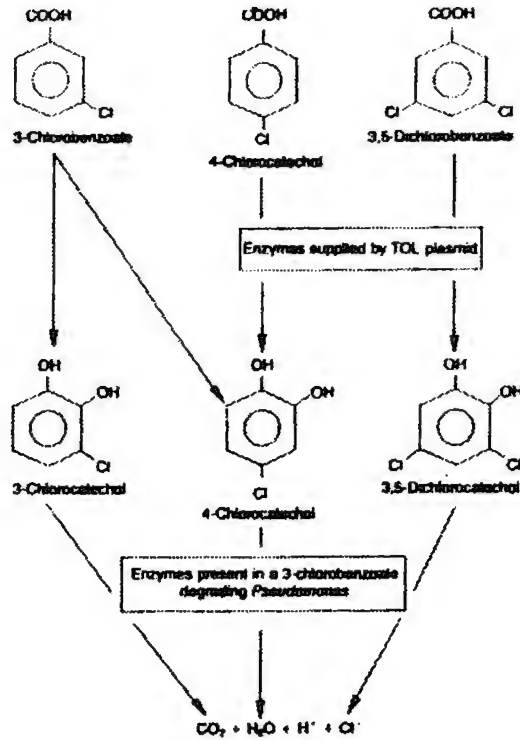
وحصلت شاكرا إبرى وزملاؤها على سلالة *P.cepacia* لها قدرة على هدم ٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic عن طريق خلط مزارع بكتيرية من مناطق ملوثة بمبيد الحشائش بسلالة بكتيرية معملية حاملة للبلازميد، ثم اختيار البكتيريا الهادمة لأحماض ٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic. وتستطيع السلالة التى تم عزلها إزالة التلوث من التربة المحتوى على ٢٠٠٠٠ جزء فى المليون من أحماض ٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic، وإعادة النمو الطبيعى للنبات.

ويعمل البكتير من خلال إطلاق الكلور من جزئى ٢,٤,٥-trichlorophenoxyacetic. وعلاوة على ذلك، فقد اتضح أن نزع النشاط الهالوجينى غير مجد، لأن باستطاعة السلالة البكتيرية أيضا أن تطلق الهالوجينات من سلسلة متنوعة من أحماض الفينيك ٦ التى تحتوى على الكلور أو البروم أو الفلور.

أحماض الفينيك: جسم صلب متبلور إبرى الشكل حريف شديد الرائحة. يستعمل محلوله مطهرا ومضادا للطفيليات، ويطلق اسم حامض الفينيك **carbolic acid** عادة على محلول هذه المادة -معجم الشهابى للمصطلحات الزراعية- المترجم.

وتعتمد مقاومة أى مركب للهدم فى الجزء الأكبر منها على الهالوجينات أو المجموعات البديلة الأخرى الذى يحتوى عليها. وبإزالة هذه المجموعات من المركبات يعتبر عاملا مهما، لأنه سيولد مركبات يمكن أن تتهدم بنظم الإنزيمات سابقة الوجود. والتحدى الثانى، هو استتساخ الجين أو الجينات المطلوبة لنزع النشاط الهالوجينى من المتجهات التى يمكن إدخالها فى البكتيريا لتنتج حتى السلالات الأكثر فاعلية لهدم المواد الكيميائية الهالو-عضوية.

وعلى الرغم من أن لدى البكتيريا إمكانات كبيرة لهدم المواد الملوثة من البيئة، إلا أن التفاعلات التى تقوم بها الكائنات العضوية لا تنتج دائما مواد أقل سمية. وتكون بعض المنتجات أحيانا أكثر خطورة من المركبات الأصلية. فعلى سبيل المثال، تحول البكتيريا مادة الـ DDT فى بعض أنواع التربة والبيئات المائية إلى مادة DDD (dichlorodiphenyl-dichloroethane) التى تعتبر مبيدا أكثر فاعلية من المركب الأصلى، وتظل أيضا لفترة أطول فى البيئة، وتعتبر شديدة السمية بالنسبة للحيوانات الراقية.



شكل ٨-١ مسار الهجين للهم فكلل للأحماض الكلورينزويكية، التي نشأت من نقل البلازميد. ويمكن أن تهدم سلالة أصلية من *Pseudomonas* حمض ٣-chlorobenzoic. تساعداً إلى ثلثي أكسيد كربون وماء وهيدروجين وأيونات كلور. ومع ذلك، لا تستطيع أن تهدم أحماض ١-chloro- and ٣,٥-dichlorobenzoic، لأنها لا تستطيع أن تحولها إلى كتكولات منظرية لها، وهو التفاعل الذي يعتبر خطوة بينية في مرحلة الهدم الكامل. ويلاحظ بلازميد *tol* إلى البكتيريا يمكن من التحول الكتكوالي للحمضين البنزويكيين، وبالتالي يساعد على هدمهما الكامل.

استخدام البكتيريا في صناعة التعدين

The use of bacteria in the mining industry

تمتد إمكانات موائمة الميكروبات للقيام بوظائف مفيدة بصورة مذهشة إلى ما أبعد من التطبيقات الزراعية والدوائية. فالبكتيريا يجري استخدامها بشكل تجاري في صناعات تعدين النحاس واليورانيوم، وتقوم البكتيريا بتعدين أكثر من ١٠% من النحاس الذي تنتجه الولايات المتحدة (أنظر الفصل السابع).

ويعتمد التعدين البكتيرى على قدرة الميكروبات على أكسدة مركبات الخامات المعدنية غير القابلة للذوبان، لإنتاج مركبات قابلة للإذابة، بينما يمكن أن تستخدم البكتيريا بطريقة أكثر سلبية فى استخلاص المعادن من المحلول، حيث تحسوى جدران الخلايا البكتيرية على جزيئات سالبة الشحنة، تجعل منها مصادم ممارة لتضم أيونات المعدن الموجبة إليها . ويحدث هذا "الامتصاص الحيوى" حتى مع الخلايا الميتة، ويعتبر ارتجاعيا، أى أن المعدن انتزاعه بسهولة من الكائنات العضوية.

ويمكن أن يخدم الامتصاص الحيوى هدفا مزدوجا، حيث يستخدم فى كلا من استخلاص أو تركيز المعادن المهمة من المخلفات الصناعية، وينقى هذه المخلفات من المعادن السامة.

ولا تعتبر البكتيريا هى الكائنات الوحيدة التى يمكن أن تستخدم بهذه الطريقة، حيث تحسوى جدران الخلايا الفطرية على مادة الكيتين^٧ التى تعتبر عديدة سكريات إنشائية، والتى تعتبر أيضا رابطا فعالا للمعادن. وقد طورت العمليات البكتيرية والفطرية تماما لمعالجة المخلفات فى مفاعلات القوى النووية واستخلاص المعادن الثمينة.

التأثير البيئى للكائنات المجهرية المهندسة وراثيا

The environmental impact of genetically engineered microorganisms

يعتمد استخدام الكائنات المجهرية فى المستقبل فى التطبيقات التى ذكرناها على مدى الإطلاق الآمن لتلك الكائنات فى البيئة. ويعتبر هذا من الموضوعات

^٧ مادة قرنية تدعم قشرة الحشرات والقشريات وتوجد أيضا لدى بعض الفطر والأشنيات. معجم المصطلحات الزراعية للشهابى. المترجم

الجدلية وغالبا ما تصاحبه خلافات حادة. ففي حين كانت بعض الكائنات المجهرية التي أطلقت إلى البيئة آمنة، إلا أن البعض الآخر لم يكن آمنا بل خطيرا.

ويتوقف إنشاء كائن عضوى جديد فى نظام بيئى^٨ على الظروف الفيزيائية والكيميائية الموجودة هناك، وعلى تفاعلات الكائن مع الأنواع المحلية. وسواء أكان الكائن العضوى المهندس وراثيا مفيدا أو غير مفيدا فى بيئة ايكولوجية معينة، فإن ذلك سيتوقف على مميزاته، وعلى خصائص النظام البيئى المستقبل له.

وعندما يستوطن كائن غريب نظاما بيئيا جديدا، فقد تحدث أو لا تحدث تأثيرات ضارة، ولكنه من المؤكد غالبا ما يحدث تغييرات من نوع معين. وقد تكون هذه التأثيرات غير محسوسة بحيث لا يمكن اكتشافها أو تكون مجتنبية للكوارث. وعلى سبيل المثال، كان لإدخال القرية الإسفنجية *gypsy moth* إلى الولايات المتحدة تأثيرات ضارة على أوراق النبات، لأن الحشرة ليست لها أحفاد طبيعيين فى أمريكا الشمالية. وراجع فرانسيس شاربلس من معمل أوك ريدج القومى فى أوك ريدج بولاية تينيسى العديد من الأمثلة الأخرى للضرر البيئى الذى يسببه إطلاق كائنات عضوية جديدة.

ويمكن أن يؤثر كائن عضوى جديد على البيئة، أما بطريقة مباشرة أو غير مباشرة. وتشمل التأثيرات المباشرة إحداث المرض أو التسمم لأنواع معينة أو طوائف الأنواع. وتهدف المعالجة الوراثية للعديد من الكائنات المجهرية بطريقة دقيقة إلى زيادة تأثيراتها السامة على أنواع الآفات فى البيئة. ومثل هذه الكائنات

^٨النظام البيئى هو النظام الناشئ من تفاعل مجتمع من الكائنات العضوية مع البيئة الموجودة بها. المترجم

المجهرية، بالرغم من أنها مصممة لأن يكون لها سلسلة محددة من العائل، إلا أنها تشكل مخاطر أيضا على الكائنات غير المستهدفة.

وتأتى التأثيرات غير المباشرة من التغييرات فى تركيب أو وظيفة طائفة كائنات محلية. فيمكن لأى كائن جديد أن يغير الطائفة تغيرا تركيبيا بعدة طرق. فقد يؤثر على سبيل المثال، من خلال افتراسه أو سيطرته على الأنواع الطبيعية من خلال مواردها الغذائية الأساسية. وقد استعرض دانيال سيمبرلوف من جامعة فلوريدا الحكومية بولاية تالاهاسى ٨٥٤ حالة، أدخلت فيها الكائنات العضوية إلى البيئة، ودرس تأثير الدخلاء الجدد على تكوين الطائفة المحلية. وعلى الرغم من تنوع تأثيرات الإدخال، إلا أن بعض البيئات عانت من نقص فى أعداد الأنواع. فقد أدت الطبيعة الافتراضية للدخلاء الجدد إلى فقد ٥٠ من هذه الحالات وإلى التعرض للهجوم من ٥١ حالة أخرى.

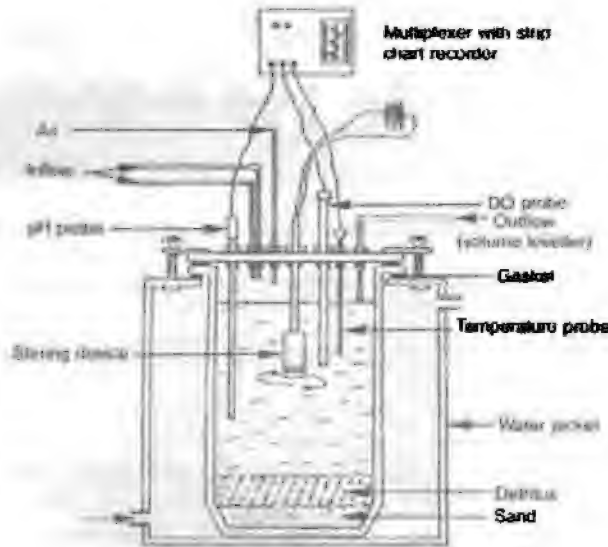
وتستطيع الأنشطة الميكروبية أن تغير من الحمضية والمحتوى الأكسجيني للماء والتربة، وتغير من توفر المواد الغذائية للنباتات والتركيبية الكيميائية للمعادن. ولما كانت تعتمد إنتاجية أى نظام بيئى على تحلل المادة العضوية والدورة الغذائية للميكروبات، فإن الإخلال بالطوائف الميكروبية، كنتيجة لإدخال كائنا عضويا جديدا، يمكن أن يغير النظام البيئى كله.

ويتوقف المصير النهائى للمادة الطبيعية والوراثية فى البيئة على بقاء واستقرار ونمو العوائل التى تأوى مجموعة العوامل الوراثية. وبالتالي يعتمد بقاء واستقرار ونمو الكائنات العضوية العائلة (الحاضنة) على مكوناتها الوراثية وعلى الخواص الفيزيائية والكيميائية للبيئة، بالإضافة إلى اعتمادها على التفاعلات مع الكائنات العضوية الأخرى الموجودة هناك.

وتشمل العوامل الفيزيائية التى تساعد فى تحديد ما إذا كان كائن عضوى جديد سيصبح مستقرا على: درجة الحرارة والضغط الجوى وأشعة الشمس

وأسطح النباتات والمواد المترسبة والعلاقات الفراغية التي تساهم في الحماية وتراكم المادة الغذائية أو المتطلبات الكيميائية للخلايا. وتشمل العوامل الكيميائية على توفر مصادر الكربون المواد الغذائية النيتروجينية وعوامل النمو والماء؛ والتركيب الأيوني للتربة والماء؛ والأس الهيدروجيني البيئي؛ تكوين الغاز؛ ووجود المواد السامة.

ولما كانت الطوائف الميكروبية جزءا بالغ التعقيد من بيئتها البيولوجية والفيزيائية والكيميائية، فيتطلب تقييم المخاطر المحتملة من إطلاق كائن مجهرى جديد نظاما تجريبيا يظهر تعقد البيئة الميكروبية. وغالبا ما تستخدم لهذا الغرض العوالم الصغرى "microcosms" التي تعتبر حظائر مسيجة تعمل من داخل المعمل، تحتوى على جزء من البيئة (شكل ٨-٢).



شكل ٨-٢ ميكروكوسم (العلم الأصفر) : تخدم في دراسة استجابة الطوائف الميكروبية المتغيرة لكائنات بيئية. ويحاط الخزّان المحتوى على العلم الأصفر بقميص من الماء. يسل على التبريد أو تسخين المحتويات، ويؤد هذا الخزّان يسلط السليبي للحصول على الهواء والماء ز - - - - - أخرى، يؤمّود بمسورة تنفق تستخدم للحفاظ على مستوى مناسب من السائل، وتستخدم المسجّت في قياس الأس الهيدروجيني - - - - - درجة الحرارة وتركيزات الهواء المذاب في الماء داخل العلم الأصفر. ويوجد رسم بياني مسجل يحتفظ بتسجيل مستمر لهذه القيم، ويطلّ معلومات عن استجابات الكائنات المجهرية التي تعيش في العلم الأصفر.

ويمكن إنشاء العالم الأصغر ،إما أن يجلب إليه عينة طبيعية،أو يعاد تكوينها في المعمل. وعلى الرغم من إنشاء عالم أصغر ،فإن فائدته تتوقف على مدى تمثيله للوضع الموجود في البيئة الحقيقية.

اكتشاف كائنات مجهرية فى عينات بيئية

Detecting microorganisms in environmental samples

يتطلب تقييم مخاطر إطلاق الكائنات المجهرية إلى البيئة،أن يجرى اكتشاف الكائن العضوى المطلوب وحصره. وليست هذه بالمهمة السهلة، لأنه يجب أن يكشف عن الخلايا فى عينات بيئية معقدة وغير متميزة، مثل التربة والرواسب المائية. وقد لا يمكن الكشف عن الكائنات المجهرية فى البيئة بالطرق التقليدية،فى حين أنها لا تزال نشطة وصالحة للتطبيق. وبغض النظر عن هذه الصعوبات المتأصلة،فقد طور رجال البيئة الميكروبية طرقا لحصر الميكروبات فى عينات بيئية تتفق مع المعايير التحليلية والفعالة،المطلوبة لآى إجراء رقابى.

وتشمل هذه المعايير، الحساسية، التى تتيح تمييز عدد قليل جدا من الكائنات المهندسة وراثيا من كمية معقدة من الميكروبات المحلية،ويجب أن تكون الطرق قابلة للتكرار أيضا بقدر كاف،لإعطاء قياسات يمكن تكرارها فى ظل ظروف قياسية،بغض النظر عن أى تغير فى المصدر وفى طبيعة العينة. ويجب أن تكون أيضا شاملة للسماح بتطبيقها على عينات من نظم بيئية متنوعة،مثل أسطح الأوراق أو مياه الخزانات الطبيعية. ويجب أن تكون محددة بالنسبة للكائن المجهرى الجارى استغلاله وراثيا أو منتجاته. وأخيرا،يجب أن تكون الطرق مجدية من ناحية التشغيل،بمعنى ذات تكلفة فعالة وقادرة على أدائها على مستوى من الخبرة العملية الموجودة فى معظم المعامل النوعية البيئية.

وتشتمل إحدى الطرق القديمة للكشف عن أنواع ميكروبية معينة في عينة معقدة، استخدام وسط مزرعة انتقائي. ويتأسس هذا الأسلوب على اشتغال الوسط المستخدم لنمو البكتيريا على مركب، الذي إما أن يعيق نمو جميع الأنواع فيما عدا النوع الذي سيكشف عنه، أو يتفاعل بصورة معينة مع هذا الميكروب أو منتجاته ليعطي خصائص واضحة ملحوظة (شكل ٨-٣).



شكل ٨-٣ استخدام صبغة للتعرف على وجود نوع معين من الكائنات المجهرية. وتربى البكتيريا *Rhodo pseudomonas capsulata* في مزرعة في وسط انتقالي يحتوي على β -bromo-1-chloro-2-indolyl-galactoside. كدليل لمولد الصبغة. وتبين المستعمرات الزرقاء مستعمرات الكائن العضوي التي يحتاج فيها إلى الجينات لهذه اللاكتوز. وتنتج البكتيريا المحتوية على الجينات المستمصة إنزيم β -galactosidase الذي يزيل galactoside من مجموعة indolyl. ويؤدي إطلاق مجموعة indolyl داخل الخلايا إلى أن تتحول إلى الأزرق.

وهناك سلسلة متنوعة متوفرة من الأوساط المزرعية الانتقائية. فإذا كان الكائن العضوي الجاري الكشف عنه مقاوما لمضاد حيوي معين، على سبيل المثال، فسيكون من الممكن تربية هذا الميكروب في وجود هذا المضاد الحيوي، بينما لا تستطيع الميكروبات الأخرى النمو في وجود هذا المضاد

الحيوى. ويمكن أن يستخدم أيضا شرط توفر نوعية غذائية غير عادية لنوع ميكروبي معين.

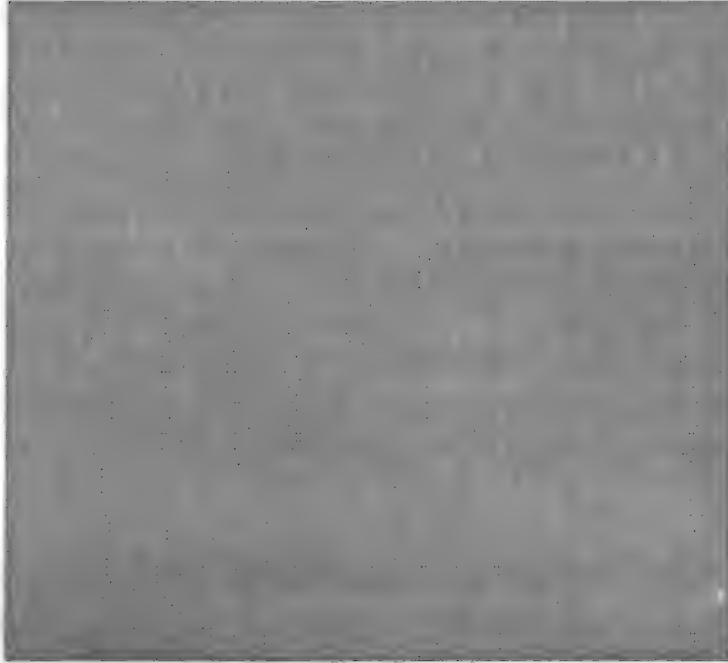
وتعتمد طرق أخرى تعتمد على المجسات التى تنتخب بشكل محدد الكائن المجهرى الجارى تحليله . وتشمل المجسات المستخدمة بكثرة، المضادات الحيوية التى تتفاعل مع بعض مكونات الخلية الميكروبية. وعادة ما تعلم الأجسام المضادة بصبغة فلورية، بحيث يمكن الكشف عنها بسهولة (شكل ٨-٤).

وأثاحت أساليب التقدم الحديثة فى تكنولوجيا الهبر ودوما، إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستساخ لأى مكون أساسى من جدار الخلية الميكروبية، ونتيجة لذلك أعطت قدرا كبيرا من المدى والتخصصية لهذه الطريقة المنهجية. وتعتبر الأجسام المضادة الفلورية أحادية الاستساخ دقيقة بدرجة كافية لتسمح للباحثين بالتعرف على أنواع مختلفة من البكتيريا الجذرية^٩ المثبتة للنتروجين، التى لها علاقة ارتباط وثيقة، وإلا سيصبح من الصعب تمييزها. وثبت جدوى الأجسام المضادة أيضا فى الكشف عن الكائنات المجهرية فى مراحلها الحياتية غير المزروعة.

وتعتبر الجينات المستنسخة نوع آخر من المجسات عالية الفاعلية. فيمكن أن تجعل معالجات معينة جديلتى الـ د.ن.أ. المزدوجة أن تنفصلا. ولا يمكن للجديلة المفردة أن تعيد تشكيل القواعد المزدوجة التى تحمل الحلزون المزدوج معا، إلا بواسطة جديلة د.ن.أ. أخرى من جينات متشابهة جدا. ونتيجة لذلك، فإن جديلة جين مستنسخة والتى طعمت بصبغة أو نظير مشع أو بعض العلامات

^٩ البكتيريا الجذرية: جنس من البكتيريا يعيش على جذور القطاى القرنية مكونا العقد الأزوتية التى تزود النبات بأزوت الهواء وتغنى التربة. معجم الشهابى للمصطلحات الزراعية. المترجم

الأخرى التى يسهل الكشف عنها، يمكن أن تستخدم فى الكشف عن جينات مماثلة فى الـ د.ن.أ لكائن عضوى.



شكل ٨-١ اكتشاف متغير معين للبكتيريا المسبب للكلبريا *Vibrio cholerae* فى عينة بيئية. تصبغ خلايا *Vibrio cholerae* بجسم مضاد أحلى الاستساخ، علم بهيئة فلورية. وتضع الخلايا المصبوغة باللون الأخضر، فى حين تصبغ البكتيريا التى ليست لديها الموروث المضاد، الذى يتعرف عليه الجسم المضاد، باللون البرتقالى.

وطورت مجسات الـ د.ن.أ أساسا كطريقة فى تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم للكشف عن مستنسخات جين محدد . ولما كانت الـ DNA's لأنوعين مختلفين متشابهان تماما، فيمكن أن تستخدم المجسات أيضا فى الكشف عن كائنات عضوية معينة فى عينات بيئية، وعن الفيروسات فى النظم المائية ومنتجات الأغذية.

ويمكن تبني هذه الطريقة للكشف عن الكائنات العضوية غير القابلة للاستزراع، عن طريق تحليل د.ن.أ. ميكروبي، تم عزله من عينات بيئية بطريقة مباشرة. ويمكن أن تستخدم في تقدير وفرة كائن عضوى معالج وراثيا فى عينة، لأنه يمكن الكشف عن الجين الغريب الذى يحتوى عليه هذا الكائن العضوى بسهولة فى الد.ن.أ. كله بواسطة مجس مناسب.

والكشف عن كائنات مجهرية معينة بواسطة مكوناتها من الد.ن.أ. يعتبر أمرا معقدا للغاية، حيث يمكن للبكتيريا أن تبدل مانتها الوراثة مع بعضها البعض. ومع ذلك، لا تنتقل الجينات المشفرة عن ر.ن.أ. الريبوسومات بهذه الطريقة. فجينات ر.ن.أ. الريبوسومية وتسلسلات ر.ن.أ. المناظرة، تعتبر محددة لكل كائن عضوى، ويمكن أن تستخدم بسبب تميزها الواضح. ويمكن النظر إليها على أنها مونوجرامات ذاتية لأنواع البكتيرية. وقد طبق تحليل ر.ن.أ. الريبوسومى لتحديد صلة البكتيريا، ولتشخيص الطوائف الميكروبية الطبيعية.

نقل الجين بين أنواع البكتيريا فى البيئة

Gene transfer among bacteria in the environment

قد تصبح الجينات الغريبة مستقرة فى البيئة، حتى لو فشلت فى البقاء الكائنات المجهرية المهندسة وراثيا التى حملت فى الأصل الجينات . وذلك لأن الجينات الغريبة قد تنتقل إلى الكائنات المجهرية المحلية. وقد يكون الخطر الكامن الذى ينجم عن نقل هذه الجينات خطرا حقيقيا، لأن الجينات قد تصبح أكثر استقرارا داخل الميكروبات التى توطدت بالفعل فى منطقة بيئية من الجينات الموجودة فى "المتطفلات" interlopers المهندسة وراثيا.

ويمكن أن تنتقل الجينات بطريقة الاقتران ، كنتيجة للاتصال المباشر بين الخلية الواهبة والخلية المستقبلة؛ أو بواسطة الانتقال العارض transduction، الذى يحدث عند اندماج فى مجموعة العوامل الوراثية genome لفيروس بكتيرى الذى

يصيب أنواعا بكتيرية أخرى؛ أو عن طريق التحويل transformation الذى تنتقل بواسطته الـ د.ن.أ عار إلى جدار الخلية المستقبل، وتصبح جزءا من مادة العائل وراثية؛ أو بواسطة اندماج fusion خليتين بكتيريتين.

لم يقيم بعد مدى حدوث وأهمية طرق النقل هذه داخل الطوائف الميكروبية فى البيئات الطبيعية. وعلى الرغم من أن المعلومات المتوفرة تفترض أن التبدلات الوراثية تحدث مرات قليلة، فإنه يجب الإجابة على العديد من التساؤلات من أجل تقييم المخاطر التى قد تكون كامنة فى إطلاق الكائنات العضوية المهندسة وراثيا، التى قد تنقل جينات غريبة إلى الأنواع الطبيعية. هل يحدث التبادل الجينى وبأى تكرار؟ وماهى الظروف البيئية التى تؤثر على عملية النقل؟ وكيف تؤثر عمليات النقل هذه على تركيب ووظيفة طائفة الكائنات الطبيعية؟ وهل تؤثر مواقع الجينات الغريبة داخل مجموعة العوامل الوراثية للكائنات المهندسة وراثيا على نقلها؟ هل يمكن أن يكون هناك نقل من الخلايا الميتة؟ هذه الأسئلة جميعا قد بدء فى تدارسها، فى حين تساعد الطرق التى طورتهما الوراثة الجزيئية فى الوقت الحالى رجل البيئة الميكروبية على القيام بالدراسات اللازمة.

ولن تقتصر التأثيرات البيئية الناجمة عن الميكروبات المهندسة وراثيا على المنطقة التى تطلق فيها، لأن لها إمكانية الانتشار. فالكائنات المطلقة يمكن أن تصل إلى مواقع جديدة عن طريق النقل بالرياح، أو بالمياه الجارية أو عن طريق الحيوانات المهاجرة. وأن أى كائن عضوى مصمم على العمل والتواجد فى بيئة معينة، قد يصبح بطريقة مجهولة حتى الآن، لا يمكن السيطرة عليه فى موقع جديد. وعلى ذلك، فإن انتقال الكائنات العضوية المطلقة من الموضوعات المهمة فى تقييم المخاطر.

وقد عرف حتى الآن القدر الكبير عن الفيروسات الممرضة للإنسان، بسبب الرى بمياه الصرف المعالجة، وعرف أيضا الشيء الكثير عن الانتقال الشمولى

للعُدوى عن طريق بعض الفيروسات الممرضة للنبات، خاصة الفطريات التى تنتشر عن طريق أبولغها. وقد يمكن استخدام قواعد البيانات والطرق والنماذج الرياضية لدراسة لهذه الظواهر لتتبع انتقال هذه الكائنات المهندسة وراثيا. والاهتمامات المتعلقة بتوطن الكائنات العضوية المهندسة وراثيا واستقرارها فى المادة الوراثية وانتشارها فى البيئة، وإمكانية إفسادها للنظام البيئى، تحدد هذه جميعا موضوعات تقييم مخاطر التكنولوجيا الحيوية. وعندما تتم الدراسات وتتوفر المعلومات المتعلقة بتقييم المخاطر، يمكن حينئذ ترسيخ المعايير التى تحدد أمان منتجات التكنولوجيا الحيوية. ويعتبر هذا الإجراء النظامى العلمى مطلوب من أجل تحقيق الإمكانيات الصناعية والدوائية من التكنولوجيا الحيوية.

الفصل التاسع

التثبيت البيولوجي للنيتروجين Biological nitrogen fixation

الماء موجود في كل مكان، ولا توجد منه قطرة للشرب

صموئيل كولردج (١٧٧١-١٨٣٤)

مشكلة النيتروجين

The problem of nitrogen

على الرغم من أن الكلمات السابقة تشير إلى مركب الماء، إلا أنها يمكن أن تنطبق على عنصر النيتروجين^١، وبهذه الصورة، فالنيتروجين موجود حولنا بكل ما تعنيه الكلمة، إذ يشكل ٨٠% من الهواء الذي نستنشق - لكنه لا يوجد لنا من سبيل للحصول عليه، وكذلك الحيوانات والنباتات والفطر وجميع البكتيريا تقريباً، وعلى الرغم من ذلك، فالنيتروجين في صورته العضوية، يعتبر المكون الأساسي لكل الكائنات الحية، حيث تحتوى البروتينات والأحماض النووية والفيتامينات والعديد من الجزيئات "الحوية" الأخرى على النيتروجين، كيف إذن

١ - النيتروجين: جسم بسيط غازي لا لون له ولا طعم ولا رائحة يحتوى الهواء منه على ٧٩,٢% من حجمه. وهو أهم أغذية النباتات تعطاه وهو بحالة مركبات آزوتية تكون في الزيل والأسمدة الأزوتية وغيرها. ولا يمتصه النبات من الهواء إلا نادراً في بعض الأشنة والطحالب وفي فصيلة القرنيات بواسطة بكتيريا الأزوت. معجم المصطلحات الزراعية للشهابي. المترجم

يمكن توفير المخزون الهائل من غاز النتروجين الخامل لهذا الحشد الضخم من
الجزئيات العضوية النتروجينية؟

والإجابة هي التثبيت البيولوجي للنتروجين، فلدى عدد قليل نسبياً من الأنواع
البكتيرية قدرة خاصة على اختزال أو "تثبيت" النتروجين الجوى لتكوين
الأمونيا، وهو المنتج الذى يمكن أن تستخدمه النباتات والميكروبات الأخرى
كوحداث بنائية لتخليق الأحماض الأمينية، ومن ثم تخليق المركبات النتروجينية
الأخرى، وعلى مستوى عالمى، تعد كميات النتروجين التى تثبتها البكتيريا كميات
هائلة، إذ تشير التقديرات إلى أن ما ينتج منه يصل إلى مائتى مليون طن سنوياً،
وعلى مستوى أكثر محدودية، يمكن مشاهدة برهان واضح للأهمية الزراعية
والإيكولوجية لتثبيت النتروجين من خلال أطول تجربة زراعية جارية فى
العالم.

فى عام ١٨٤٣، حث جون بنيت لويز وهنرى جلبرت على القيام بما سُمى
بتجربة الـ Broadbalk فى محطة تجارب روثامستد بإنجلترا، ومنذ بدء
التجربة بذرت مساحات من الأراضى بالقمح، وتعرضت كل مساحة لنظام أسمدة
معين طوال فترة التجربة، وقدرت غلة الحبوب سنوياً، وجاءت نتائج ثلاث
مساحات، عومل كل منها بنوع مختلف من الأسمدة بشيء يستحق التفكير .

عولجت إحدى هذه المساحات بصورة مستمرة بسماد نتروجينى، بكميات
مماثلة لما يستخدم بصورة طبيعية فى زراعة غرب أوروبا، ولم تعالج
المساحتان الأخرى بسماد نتروجينى ، وكانت نتيجة المساحتين غير المسمدتين
أن ظهرت الأعشاب فى إحداها، بينما لم تتم أية محاولة لاستئصال العشب من
المساحة الأخرى.

ومما لا يثير الدهشة، أن يكون محصول القمح الذى عولج بالسماذ النتروجينى محصولاً وفيراً ، بما يعادل سنة أطنان تقريباً للهكتار فى العام، بالمقارنة بمحصول المساحتين غير المسمدتين ، ومن النظرة الأولى، تبدو نتائج هاتين القطعتين متناقضة ظاهرياً، فالقطعة التى نمت بها الأعشاب كان محصولها السنوى من القمح أربعة أطنان، حوالى ضعف إنتاج القطعة التى بدون عشب، ومع ذلك، فلم تكن هذه الأعشاب مجرد أية أعشاب، فقد كانت عبارة عن البيقعة (نبات علفى) والبرسيم، وهما عضوا أحد العائلات النباتية، العائلة البقولية.

ويمكن أن يزدهر نمو النباتات البقولية فى ظل ظروف محدودة من النتروجين، لأنها تصنع علاقة تكافلية فعالة مع البكتيريا المثبتة للنتروجين من الجنس الجذري *Rhizobium* (شكل ٩-١)، فالبكتيريا توفر نتروجين مثبت لتساعد نفسها والبقول على النمو، بعد ذلك، عندما تموت النباتات، تصبح التربة غنية أيضاً بنتروجين مثبت كاف لزيادة غلة القمح فى القطعة غير المعشبة بحوالى ٢ طن فى الهكتار أكثر من القطعة المعشبة، وتظهر التجربة بشكل واضح أنه يمكن يستبدل التثبيت البيولوجى للنتروجين على الأقل إلى حد ما، بالسماذ النتروجينى التجارى، خصوصاً عندما يكون ميكروب التربة المثبت للنتروجين مصاحباً لنبات عالى الخضرة.

وعلى الرغم من ذلك، فحتى المساحة الخالية من العشب تنتج طنين من القمح لكل هكتار، ومصادر النتروجين لدعم هذا النمو ثلاثة: (١) تكون الأكاسيد النتروزية والملوثات الأخرى من البرق والمنشآت الصناعية، (٢) الإطلاق الكيمايى البطيئ للمركبات النتروجينية من التربة، (٣) التثبيت البيولوجى للنتروجين بواسطة بكتيريا التربة التى ليست لها علاقات تكافلية مع النباتات البقولية.

والهدف بعيد المدى لبرامج الأبحاث طويلة الأجل للتثبيت البيولوجي للنتروجين، هو التقليل من الاعتماد الحالى على الأسمدة الكيميائية لنمو المحاصيل النباتية، من خلال تحسين فاعليات ونطاقات الكائنات العضوية المثبتة للنتروجين، وينتج كل عام حوالى ٢٠ مليون طنا من السماد النتروجينى ، وتصنع جميعها تقريباً بواسطة عملية Haber-Bosch ،حيث يتم خلالها تمرير نتروجين غازى وهيدروجين على حفاز عند درجة حرارة وضغط عالين لتكوين الأمونيا.

ولما كانت إحدى المواد الأولية لهذا التفاعل هى غاز الهيدروجين،فإن تخليق الأمونيا يعتبر مستهلكاً للطاقة. وعلى الرغم من أن تكاليف الطاقة لا تشكل حالياً تهديداً اقتصادياً، مثل أيام أزمة الطاقة فى فترة السبعينات،فإن التنبوء بتأثير تقلبات السياسة والاقتصاد على تكاليف الوقود فى المستقبل القريب والبعيد يعد من الأمور الصعبة، بالإضافة إلى ذلك، لا يتوفر لكثير من المناطق الزراعية فى العالم الأموال الكافية لشراء الأسمدة النتروجينية التجارية من أجل الحصول على إنتاجية مرتفعة من المحاصيل.



شكل ١-٢ توضيح فوفد البكتيريا الجذرية *Rhizobium* على نمو نباتات البويا الذهبية *Phaseolus beans*، زرعت النباتات الثلاثة بمزيج من روث وأوراق للشجر لم يضاف إليها سماد نتروجيني، والنبات الموجود على اليسار لم تضاف إليه البكتيريا الجذرية في قلع التثبيت الأوسط بسلالة ففيرة في تثبيت النتروجين *R. phaseol* واختير للنبات الموجود في يمين الصورة سلالة من بكتير على الأداء.

ويعد التحول من الأسمدة الكيميائية التجارية إلى النتروجين المثبت بيولوجياً أمراً مرغوباً أيضاً من وجهة النظر البيئية ، حيث تتلف معظم الأسمدة الكيميائية التي تستخدم مع المحاصيل بسبب ارتشاحها من التربة، وفي أسوأ الظروف، فقد ينشأ عن ذلك تركيزات عالية من النترات غير مقبولة في ماء الشرب، ويؤدي إلى تشبع المجارى المائية بنمو مفرط من الطحالب والكائنات الأخرى التي تنمو على النباتات، ونقص شديد في الأسماك والحيوانات البحرية المحارية.

رتب الكائنات العضوية المثبتة للنيتروجين

The range of nitrogen-fixing organisms

يظهر فى أى قائمة من قوائم البكتيريا المثبتة للنيتروجين (جدول ٩-١) عدد من السمات، أولاً، الجميع من البكتيريا: من النوع البسيط بدائى التنوي prokaryotes، وبرغم الأبحاث العديدة، فلم توجد حتى الآن مثبتات نيتروجين من بين الأنواع سليمة التنوي eukaryotes، وكما توضح لنا تجربة Broadbalk، فإن الأعشاب البقولية التى تحصل على النيتروجين المثبت بيولوجياً بطريقة غير مباشرة، لها ميزة اختيارية قوية عن الأعشاب الأخرى فى التربة المفتقرة إلى النيتروجين، وإذا كانت القدرات المثبتة للنيتروجين تضىء ميزة اختيارية على أى كائن عضوى، فلماذا لم توجد خمائر مثبتة للنيتروجين، على سبيل المثال؟ ولماذا لم تتطور خلايا النترىت nitroplasts مثل خلايا الكلور chloroplasts وتتطور الميتاكوندريا (الفتيلة الحبيبية) بشكل ظاهرى، من بكتيريا شغلت مكان دائم فى الخلايا، وأقامت معظم علاقات التكافل الحميمة؟ إن الإجابة عن هذه الأسئلة غير معروفة، فقد تكون القدرة على تثبيت النيتروجين قد ظهرت منذ فترة قريبة نسبياً، ولم يمض الوقت الكاف حتى تتشأ بكتيريا سليمة التنوي مثبتة للنيتروجين.

ثانياً، يعتبر كل أعضاء نادى تثبيت النيتروجين فمن الناحية التصنيفية سلاسل كبيرة ومنتشرة الوجود، فقد وجد أعضاء لها فى مجموعات متنوعة مثل البكتيريا الزرقاء Cyanobacteria الطحالب الزرقاء-الخضراء، والبكتيريا البدائية وفى كل من بكتيريا سلبية الجرام وبكتيريا إيجابية الجرام (وهما المجموعتان

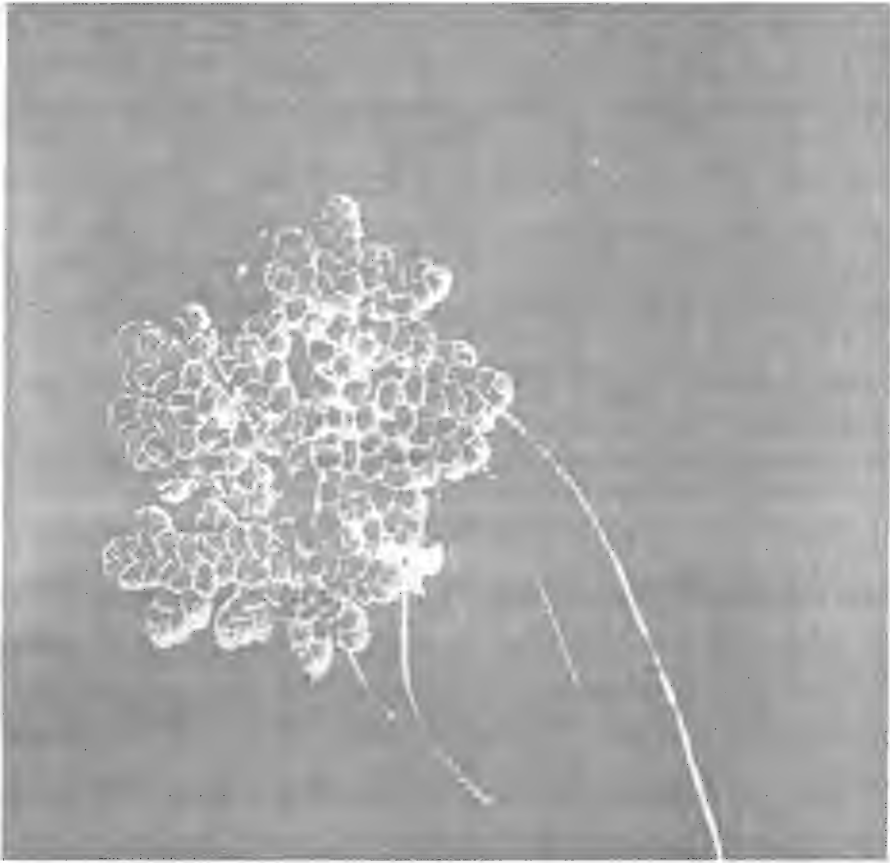
تحت الرئيستين التي تم تمييزهما على أساس قدرتهما على قبول صبغة جرام التي استتبطها الفيزيائي الدنمركي كريستيان جرام)، ومع ذلك، لا توجد داخل كل من هذه المجموعات إلا سلالة أو نوع يثبت النتروجين أحياناً، وقد يكون سبب التوزيع التصنيفي، هو النشوء الجانبي، والذي انتقلت من خلاله جينات تثبيت النتروجين، جينات nif حسب ما يطلق عليها، من نوع لآخر.

جدول ٩-١ بكتيريا مختارة مثبتة للنتروجين

النوع	المجموعة البكتيرية	تطبيقات
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram- negative	نظام نموذجي لوراثيات جينات nif
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Gram- negative	تثبت النتروجين من الجو، وتحتوى على بروتين يحمي إنزيم نتروجيناز من ضرر الأكسجين.
<i>Rhizobium species</i>	Gram- negative	تثبت النتروجين فى عقد جذور النبات البقلى.
<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas</i>	Gram- negative	بكتيريا التخليق الضوئى الإرجوانية-الخضراء
<i>Frankia</i>	Gram-positive actinomycete	تثبت النتروجين فى عقد جذور الكثير من الأشجار والشجيرات المعشبة
<i>Clostridium</i>	Gram-positive	لاهوائية إجبارياً
<i>Anabaena</i>	Filamentous Blue-green alga	تثبت النتروجين فى خلايا متخصصة تسمى هيتروسايتس، وترتبط بعض الأنواع نباتات راقية مثل السيكاقيات والأزولا.
<i>Methanococcus</i>	Archaeobacterium	
<i>Azospirillum</i>	Gram- negative	تصاحب جذور الحشائش

ثالثاً: لا تثبت العديد من البكتيريا النتروجين بنفسها، لكنها تتفاعل بصورة تكافلية مع النباتات الراقية، ويرجع السبب في هذا إلى مسألة الطاقة، فالرابطة الثلاثية التي تربط ذرتي النتروجين الموجودتين في جزيء النتروجين الغازي، هي رابطة يصعب كسرها، وكما أن هناك تكلفة مرتفعة لإنتاج الأمونيا بطريقة كيميائية، فهناك عبء طاقة مرتفع يقع على كاهل البكتيريا المثبتة للنتروجين، وعندما تصاحب البكتيريا النباتات الخضراء المثبتة للكربون، تكون النتيجة تبادلاً غذائياً رائعاً بين البكتيريا والنبات، حيث يحصل النبات على نتروجينه المثبت وتحصل البكتيريا على الكربون المثبت الذي تحتاجه للحصول على الطاقة.

وتتنوع هذه العلاقات التكافلية تنوعاً كبيراً، فبالإضافة إلى التفاعل بين البقوليات وأنواع عديدة من البكتيريا الجذرية *Rhizobium genus*، توجد على سبيل المثال، مشاركة بين الطلح الأزرق-المخضر المثبت للنتروجين وأزولا *water fern Azolla* (شكل ٩-٢) الذي استخدم منذ قرون عديدة كمصدر للسماد النتروجيني في حقول الأرز، ومع ذلك، لا تقتصر العلاقات التكافلية على النبات والبكتيريا فحسب، فالنمل الأبيض *Termites*، الذي يلتهم الأخشاب، يحتوي في معدته على طوائف من البكتيريا المثبتة للنتروجين، تساعد الحشرات على التغلب على نقص النتروجين في غذائها الرئيس.



شكل ٢-٩ ورقة سرخسية من سرخسة مزهرة من جنس *Azolla caroliniana*. تحتوي كل ورقة من السرخس على تجويف صغير يحمل الطحلب الأزرق-الأخضر *Anabaena azollae* المثبت للتروجين، وتستخدم السرخسة المزهرة في تسميد حقول الأرز في جنوب شرق آسيا.

الكيمياء الحيوية لإنزيم النتروجيناز

Biochemistry of nitrogenase

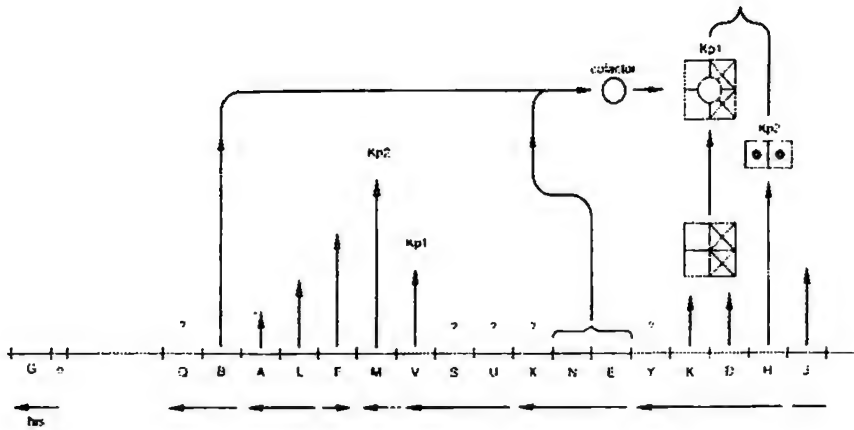
تعتمد القدرة الخاصة لبكتيريا تثبيت النتروجين على اختزال عنصر النتروجين إلى أمونيا على احتوائها على نظام إنزيمى يسمى "مركب النتروجيناز"، ويبدو أن المركب متشابه تماماً فى كل مثبتات النتروجين التى تمت دراستها حتى الآن، ويمكن تطبيق المعلومات المأخوذة من إحدى هذه المثبتات على جميع المثبتات الأخرى.

وتفيد المعارف الحالية بأن مركب النتروجيناز يتكون من ستة بروتينات ويحتوى على نشاطين إنزيمين مختلفين، أحدهما يسمى نتروجيناز، والآخر يسمى نتروجيناز ريكزاز (شكل ٩-٣)، ويحتوى جزء النتروجيناز فى المركب على أربعة وحدات فرعية، أى نسختان لكل من البروتينين المختلفين، ويحتوى تركيبه أيضاً على عامل مساعد cofactor، وهو العامل المساعد حديد-موليبدينوم الذى يحتوى على معدن الحديد والموليبدينوم، وبرغم سنوات الدراسة الطويلة لتركيب العامل المساعد، إلا أنه لا يزال مجهولاً.

والتفاصيل الدقيقة لكيفية عمل النتروجيناز ليست واضحة تماماً، فعنصر النتروجين يرتبط ولاشك بالعامل المساعد والذى بعده يختزل إلى أمونيا عن طريق إضافة أيونات الهيدروجين والإلكترونات، ويتم الحصول على أيونات الهيدروجين من الماء خلال عدة خطوات، ولا تزال طبيعتها الدقيقة مسألة جدلية. ويعد اختزال النتروجين عملاً مكلفاً للطاقة؛ حيث يحتاج اختزال جزيء واحد من النتروجين إلى أمونيا حوالى ٢٠ إلى ٣٠ جزيء من ثلاثى فوسفات

الأدينوزين (ATP)، وهو العامل المسؤول عن طاقة الخلية، وعلاوة على ذلك، ينطوى تفاعل النتروجيناز على بعض الإسراف، حيث يختزل أيضاً أيونات الهيدروجين إلى جزيء هيدروجين، وينطلق في صورة غاز.

ويحتوى نتروجيناز ريكزاز ذا الوزن الجزيئى ٦٠٠٠٠، على وحدتين فرعيتين من البروتين المتماثل، الذى له صفة اللون البنى، لاحتوائه على عناقيد من الحديد والكبريت (شكل ٩-٤)، وكما يوحى اسم الإنزيم، فإنه يختزل النتروجيناز، ومن ثم يسد نقص الإلكترونات المستخدمة فى اختزال النتروجين، ويكتسب الريكزاز الإلكترونات التى نقلها من بروتينات أخرى، والتى تتغير هويتها الحقيقية فى مختلف البكتيريا المثبتة للنتروجين.



شكل ٩-٣ مجموعة جينات *nif* لبكتيريا كليبسلا الرئوية، رتبت جينات *nif* التسعة عشر فى ثمان وحدات نمسخية، وتوضح الأسهم أبعاد وتوجيه هذه الوحدات النمسخية، وعندما تعرف أواخر جينات *nif* الفردية بشكل محدد، فبها تظهر على المخطط، حيث يحدد جين *nifH* متعدد ببتيد إنزيم نتروجيناز ريكزاز (*Kp2*)، ويحدد الجينان *nifK* و *nifD* متعدد ببتيد النتروجيناز (*Kp1*)، ويحتمل أن يستخدم جين *nifQ* فى استئصال الموليبدنوم، وقد يستخدم الجينان *nifU* و *nifS* فى تصنيع النتروجيناز، ويسمى الجينان *nifA* و *nifL* فى تنظيم الجينات الأخرى فى المركب، ويعتبر *Fe-Mo cofactor*، عامل مساعد الحديد-الموليبدنوم.



شكل ٩-٤ تنقية النيتروجيناز . ينقى النيتروجيناز الذي يتم الحصول عليه من بكتيريا كلوبستريا الرنوية بواسطة عمود الفصل الكروماتوجرافي (أي عن طريق الإمتزاز في طبقات مختلفة للتون)، و تظهر بروتينات النيتروجيناز (المنطقة الداكنة) باللون البنى لاحتوائها على الحديد.

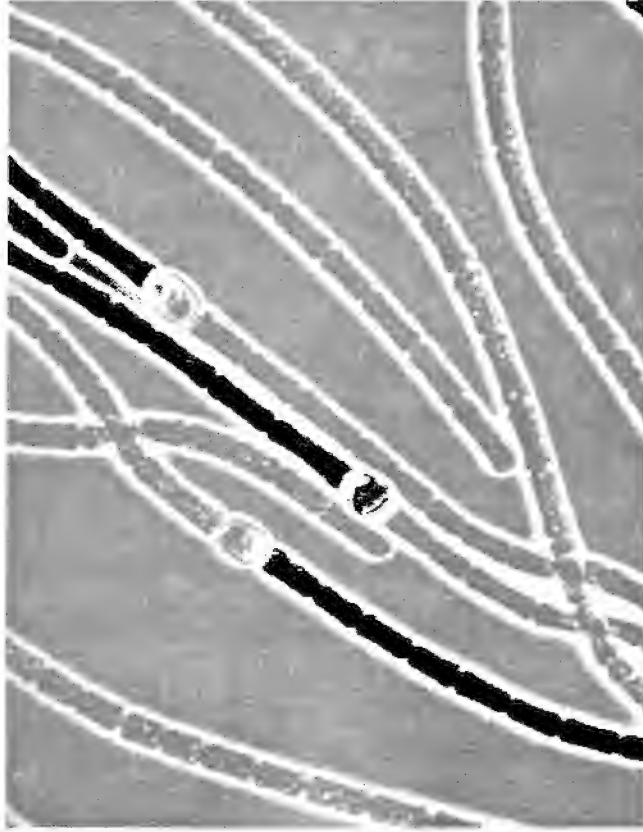
مشكلة الأكسجين

The oxygen problem

وهناك نقطة أخرى في غاية الأهمية بالنسبة للنيتروجيناز، وهي تسممه بفعل الأكسجين، فعندما يتعرض الإنزيم للجو، يفقد بشكل نهائى نصف نشاطه في غضون ثلاثين ثانية، وهي مشكلة يبدو أنها مشتركة بين جميع النيتروجينازات المثبتة للنيتروجين، وقد وجدت الكائنات العضوية المختلفة طرق متنوعة، البعض منها عادى، ولكن البعض الآخر بارع جداً لحل مشكلة الأكسجين. وإحدى الحيل البارعة التى تتبعها بكتيريا من جنس المجزآت المغزلية *Clostridium* genus، هي أن تعيش في بيئة خالية من الأكسجين، وبالنسبة لهذه البكتيريا، لن يحدث

تخطر الناجم من ضرر الأكسجين ، وهناك مثبتات نتروجينية أخرى، مثل بكتيريا كليبسلا رئوية *Klebsiella pneumoniae* يمكن أن تعيش إما مع الأكسجين أو بدونه، لكنها لا تثبت النتروجين إلا عندما تنمو بطريقة لا هوائية.

والطحالب الخضراء-الزرقاء، التي يمكنها القيام بكل من التمثيل الضوئي وتثبيت النتروجين، يبدو أنها تلعب بالنار، لأن الأكسجين ينطلق بصورة نشطة أثناء التمثيل الضوئي، ومع ذلك، فلهيها طريقتين على الأقل للتعامل مع هذا الخطر المحتمل . فهناك فاصل زمني في بعض الطحالب الزرقاء-الخضراء لتثبيت النتروجين، الذي يحدث عادة أثناء الليل، ويحدث التمثيل الضوئي أثناء النهار، وقد طورت الطحالب الزرقاء-الخضراء ذات الخيوط العديدة، مثل *Anabaena* حلا أكثر تعقيداً، فخلايا الخيطيات تقوم بالتمثيل الضوئي بصفة عامة، ولكن في الظروف التي يفضل فيها تثبيت النتروجين، يتميز البعض منها لينتج خلايا غير ممثلة للضوء متميزة من ناحية الشكل، تقوم بتثبيت النتروجين (شكل ٩-٥).



شكل ٩-٥ خيوط طحلب من جنس *Anabaena* blue-green alga ، تقوم الخلايا المستطيلة بعملية التمثيل الضوئي بينما لا تقوم بتثبيت النيتروجين ، حيث يسمم الأكسجين المنطلق أثناء عملية التمثيل الضوئي الإنزيمات المثبتة للنيتروجين ، والخلايا البيضاوية الكبيرة متغايرة المثقة "heterocysts" هي التي تقوم بتثبيت النيتروجين، وتصل الجدران المسطحة لمتغايرات المثقة على منع الأكسجين من الدخول، وتعتمد نشاط الإنزيمات المثبتة للنيتروجين.

وراثة تثبيت النيتروجين

Genetics of nitrogen fixation

يجرى دراسة عدد متزايد من بكتيريا تثبيت النيتروجين بأساليب الوراثة والبيولوجيا الجزيئية، لكن الكائن العضوى التجريبي الأصيل فى هذه الدراسات والذي حظى بالفحص والدراسة إلى حد بعيد، هو بكتيريا *كليبسلا الرئوية*

Klebsiella pneumoniae ، وهذا البكتيريا من النوع غير التكافلي، وينمو بصورة أفضل في المزرعة، وعلاوة على ذلك، فإنه يتعرض لنفس التحايل الوراثي التي تعرضت لها بكتيريا أ.كولاي التي تنتسب إليه.

وما تم معرفته عن جينات *nif* لبكتيريا كليبسلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*، لم يقدم إطاراً فكرياً فحسب لدراسة الوراثة الكيمياء حيوية لتثبيت النتروجين، لكنه قدم أيضاً أدوات سهلت بدرجة كبيرة تحليل عملية تثبيت النتروجين في البكتيريا الأخرى، التي تعتبر أقل خضوعاً للتحليل الوراثي، وقد أجريت معظم الأبحاث على تمييز وعزل جينات *nif* لبكتيريا *Klebsiella pneumoniae* في وحدة تثبيت النتروجين بجامعة Sussex بانجلترا، التي يترأسها جون بوسيتاج، وفي معامل ونستون برييل في جامعة Wisconsin (ماديسون)، وفريدريك أوسيل بجامعة هارفارد في كمبردج، بماساشوستس.

وهناك منطقة صغيرة نسبياً من كرموسوم بكتيريا كليبسلا الرئوية، عندما تنقل إلى بكتيريا أ.كولاي، تسمح للخلايا المستقبلية بأن تثبت النتروجين، وهي نتيجة توضح أن جينات *nif* لبكتيريا كليبسلا الرئوية تتجمع على د.ن.أ كروموسومي، وعلى الرغم من أن اختزال النتروجين إلى أمونيا، يبدو أنه تفاعل مباشر، حيث تخصص بكتيريا كليبسلا الرئوية للتفاعل ما لا يقل عن ١٧ جيناً، تشغل حوالي ٢٢ كيلو قواعد من الد.ن.أ في عنقود جين *nif* (شكل ٩-٣).

ويحدد جين *nifH* بروتين نتروجيناز ريكثاز، ويشفر الجينان *nifD* و *nifK* عن عنصرى البروتين للنتروجيناز، وهناك خمس جينات (*nifB, Q, V, N* and *E*) مستخدمة بطريقة ما غير محددة حتى الآن ، في تخليق العامل المساعد حديد-

موليبدينوم، وتحدد الجينان (nifJ و nifF) متعدد الببتيد المطلوب لنقل الإلكترون إلى النتروجيناز رديكتاز، وهناك ثلاث جينات (nifM, nifS و nifV) يتطلبها النضج الوظيفي الكامل لمركب نتروجيناز، ويبدو أن الجينين nifA و nifL ينظمان تعبير كل جينات nif الأخرى، وأخيراً، لا تزال وظائف الجينان nifX و nifY مجهولة حتى الآن.

وظهر أن العديد من جينات nif لكائنات عضوية أخرى مثبتة للنتروجين، شبه في تركيبها تماماً تركيب بكتيريا كليبسلا الرئوية، على الرغم من أن الجينات في مثبتات النتروجين الأخرى، توجد عادة مبعثرة حول مجموعة العوامل الوراثية genome بدلاً من تجمعها بصورة متماسكة كما هو الحال في بكتيريا كليبسلا الرئوية.

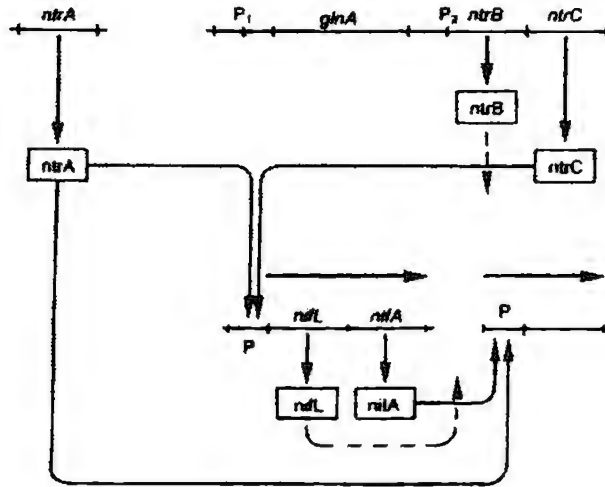
تنظيم تعبير جين نيف

Regulation of nif expression

إذا كان لدى البكتيريا المثبتة للنتروجين، مصدر مناسب من النتروجين المثبت، مثل الأمونيا أو الجلثاميت أو الأسمدة، لكان قد توقف نسخ جينات nif، بحيث لا تبدد الكائنات العضوية طاقتها المطلوبة لتخليق البروتينات، ولا تبدد ثلاثي فوسفات الاديوسين المطلوب للقيام بتفاعل الاختزال، وعندما تتعرض الجينات للجو، لا يعبر عنها أيضاً، ويؤدي هذا أيضاً إلى فهم بيولوجي جيد،

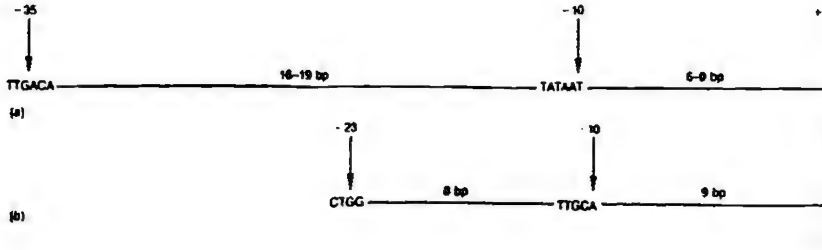
ما الهدف من تخليق النتروجيناز، إذا كانت تأثيرات الأكسجين السامة ستخنقه منذ لحظة انطلاقه؟

ومرة أخرى، قدمت دراسات بكتيريا كليبسلا الرئوية نموذجاً لتحليل تنظيم جين *nif* في مثبتات النتروجين الأخرى (شكل ٩-٦). و تظهر الدراسات أن تنظيم جين *nif* معقداً تماماً، إذ يتضمن على كل من التحكم المحلي للجينات داخل مركب *nif*، وعلى السيطرة الأكثر شمولاً للجينات المنظمة الموجودة في كل مكان في مجموعة العوامل الوراثية، ويتطلب بدء تعبير جينات الـ *nif* مثل كل الجينات الأخرى، إنزيم بوليمراز الـ ر.ن.أ لنسخ الـ د.ن.أ في ر.ن.أ الرسول.



شكل ٩-٦ تنظيم تعبير جين *nif* في بكتيريا كليبسلا الرئوية ، والعلاقة بين نسخ جين *nif* ، وجينات *ntrA* و *ntrB* و *ntrC* . وكما أوضحنا بالانص، يصل جين *nifA* يصل على تنشيط محرضات جينات *nif* الأخرى، ولكن في وجود الأكسجين والأمونيا، يمنع جين *nifL* هذا التنشيط (الخط المتقطع)، ويحتاج جين *nifA* أيضاً، الذي يقوم بدور الوسيط في عملية التنشيط إلى منتج جين *ntrA*، وبالمثل، ينشط الجين *ntrC* مع الجين *ntrA* المثبر *nifL* و *nifA* ولكن في وجود نسبة عالية من الأمونيا فإن الجين *ntrB* يوقف هذا النشاط، ويمكن للجينين *ntrB* و *ntrC* ان ينسخا أي محرض من المحرضين، ويشارك أحدهما (P_1) أيضاً في نسخ جين *glnA*، وهو الجين الإنشلي لازيم جلتامين سونستاز.

والمثيرات Promoters هي مناطق التحكم عند بداية الجينات التي يجب أن يرتبط بها بوليمراز الـ ر.ن.أ أثناء بدء النسخ، وتعتبر التسلسلات النكليوتيدية لمحرضات جين *nif* مختلفة جداً عن جينات بعض البكتيريا التي درست بشكل جيد، وهي بكتيريا أ.كولاي (شكل ٩-٧). ويوحى هذا بأن بوليمراز الـ ر.ن.أ الذي يتعرف على جينات *nif* للمحرضات، يختلف عن الإنزيم الذي يرتبط بمحرضات الجينات الأخرى، وفي واقع الأمر، فقد تم تأكيد هذا الافتراض مؤخراً.



شكل ٧-٩ الاتجاه المعكسي لتسلسلات المحرض من جينات *nif* ومن جينات أ.كولاي، وتظهر بداية النسخ بالعلامة +١ (bp) هو اختصار لكلمة التزاوج القاعدي (، ولمحرضات أ.كولاي (a) تسلسلات محفوظة عند -٣٥ و -١٠ بالنسبة لبداية النسخ، بينما تختلف محرضات *nif* (b) في كل من هويتها وفي تباعد تسلسلاتها المحفوظة.

وتبطل تماماً الطفرات الموجودة بجين يسمى *ntrA* (حيث تشير *ntrA* إلى تنظيم النتروجين)، الذي لا يعتبر عضواً من مركب جين *nif* تثبيت النتروجين، وقد أثبت بوريس ماجاسانيك من معهد ماساشوستس للتكنولوجيا في كمبردج بولاية ماساشوستس و أس.كستو من جامعة كاليفورنيا في دافيد، أن الجين *ntrA* يشفر عن بروتين يسمى معامل سيجماءيكسب بوليمراز الـ ر.ن.أ القدرة على التعرف على محرض جين *nif* ، وبدون هذا البروتين، فلا يمكن نسخ جينات *nif* وأيضاً الجينات المنظمة *nifA* و *nifL* ، ولن يحدث تثبيت للنتروجين. وتساعد

عوامل سيجما أخرى بوليمراز الـ ر.ن.أ على التعرف على مثيرات الجين الأخرى.

بيد أن مجرد الحصول على بوليمراز الـ ر.ن.أ الصحيح، لا يعد كافياً لأن يحدث نسخ جين *nif* ، وهناك جين من داخل المركب، وهو جين *nifA* يصنع بروتينا، يعتبر ضرورياً أيضاً لإحداث نسخ جين *nif* ، وتعبير الجين *nifA* بنفسه ينشط ويخمد تبعاً للظروف البيئية .

وجين *ntrA* وثلاث جينات إضافية -*ntrB* و *ntrC* - تعتبر جزء من النظام الشامل الذى ينظم الأوجه العديدة لعملية أيض النتروجين فى البكتيريا، وفى غياب مصادر النتروجين، مثل الأمونيا والجلتاميت، فإن المنتج *ntrC* ينتقل إلى الجينات التى تجعل البكتيريا تستخدم المركبات الأخرى المحتوية على النتروجين، والتى تكون عادة من المصادر غير المفضلة لهذا العنصر، ومن بين الجينات التى ينتقل إليها المنتج *ntrC*، جين *nifA*، الذى ينشط حينئذ مركب جين *nif*، ويعيق منتج *ntrB* تنشيط هذا الوسيط *ntrC* لجينات *nif* عندما تكون تركيزات الأمونيا عالية، وأخيراً، يسهم جين *nifL* فى إعاقه تعبير جينات *nif* فى وجود مصدر نتروجينى، مثل الأمونيا أو فى وجود الأكسجين، وعندما يتعرض منتج *nifL* للأمونيا أو الأكسجين، فيبدو أنه يمنع بروتين *nifA* من إحداث نسخ جينات *nif* أخرى.

التثبيت التكافلي للنتروجين

Symbolic nitrogen fixation

البكتيريا الأكثر أهمية في تثبيت النتروجين من الناحية الزراعية والبيئية، هي تلك البكتيريا التي تصنع مع النباتات علاقة تكافلية، التي إما أن تكون علاقة تكافلية بسيطة أو مركبة، ففي أحد التفاعلات البسيطة، يعيش البكتير *Azospirillum* حول أسطح جذور الحشائش، على رغم وجود علامات استفهام فيما إذا كانت النباتات تتلقى أية مساهمة محسوسة من النتروجين من هذا الاتحاد.

ولا تنشأ تلك التساؤلات في حالة التفاعلات الأكثر تعقيداً بين بكتيريا من النوع الجذري *Rhizobium* والبقوليات، أو بين بكتير *Frankia* وعدد مختلف من الأشجار والشجيرات بما فيها شجر جار الماء *alder*، وتستطيع البقوليات أن تعيش في تربة فقيرة بالنتروجين، نتيجة لعلاقاتها التكافلية في تثبيت النتروجين، وأهمية هذه العائلة في الزراعة أهمية كبيرة، فالعديد من المحاصيل البزرية العالمية بقوليات، تضم فول الصويا والبالزاء والفول والفول السوداني والعدس والحمص، ويجب أن تضاف إلى هذه البقوليات البقوليات الورقية مثل البرسيم والبرسيم الحجازي، التي تتغذى عليها الحيوانات، ولا يستخدم أى من عوائل بكتيريا *Frankia* في الزراعة، لكنها غالباً ما توجد كأنواع رائدة، تساعد على استصلاح الأراضي البور.

ويتطلب فهم هذه العلاقات التكافلية، تحليل ليس فقط لجينات *nif*، ولكن أيضاً للنبات الخاص والجينات البكتيرية التي تجعلها تشترك في هذه العلاقات المعقدة،

ومن النظرة الأولى، يبدو أن أفراد البكتيريا من النوع الجذري *hizobium*، بكتيريا عادية قضيبيّة الشكل (شكل ٩-٨)، ولا تستطيع معظم السلالات أن تتحايّل لتثبيت النتروجين، عندما تنمو بمفردها في المزرعة، ومع ذلك، فلدى هذه البكتيريا القدرة الفريدة على التعرف وغزو بقوليات معينة، وتحدث في النبات العائل استجابة متناسقة، تتضمن على انقسام خلية منتظم وتخليق سلسلة من البروتينات.



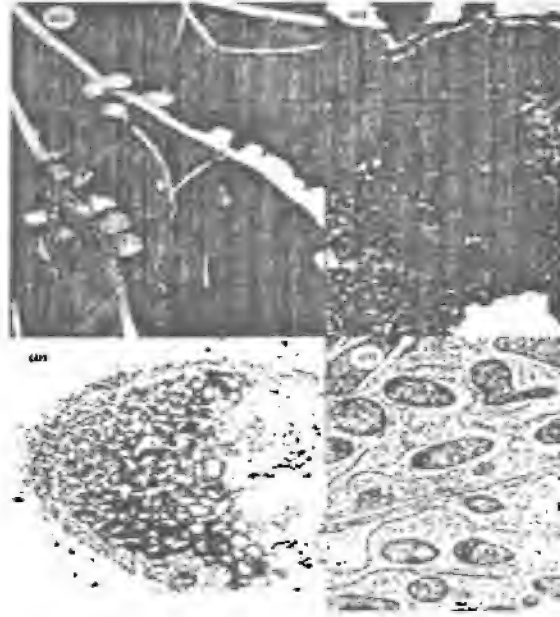
٩-٨ بكتيريا جذرية على شعيرة جذرية ١، وتوضح صورة المسح الإلكتروني بكتيريا قضيبيّة الشكل ملتصقة بشعيرة جذرية لنبت القزلاء.

وعادة ما يكون موقع الإصابة عند طرف شعيرة جذرية نامية، التي إما أن تلتف أو تنفرع أو تتكولب، تبعاً للبكتيريا الغازية (شكل ٩-٩)، وتدخل البكتيريا من خلال خيط الإصابة، وهو الأنبوب الذي يصنعه النبات، والذي ينمو بجوار الشعيرة الجذرية ويتضاعف هناك، ووجود خيط الإصابة، الذي يحتمل أن يرتبط

بإشارات من البكتيريا الجذرية على سطح الجذر، يحدث انقساماً للخلايا الموجودة في الجذر، ونتيجة لذلك يكون عقدة أولية incipient nodule، ومع تطور العقدة، يستمر خيط الإصابة الأولى في النمو والتفرع، ويتقدم خلال وبين الخلايا الجذرية للنبات العائل. وتتكمش البكتيريا داخل خيط الإصابة وتحاط بغشاء نباتي معين، وبعد ذلك تنتشر في سيتوبلازم الخلايا العقدية (شكل ٩-١٠).



شكل ٩-٩ شعر جذري ملقح لنبت بـ *Bradyrhizobium* ، ينشوء الشعر الجذري بعد إصابته بالبكتيريا الجذرية ، ويمكن رؤية خيوط الإصابة الذي ينقل البكتيريا داخل التليث في مركز الشعيرة.



شكل ٩-١٠ منظومة عقد نبت البزلاء، التي أوجدتها وشكلتها البكتيريا *Rhizobium leguminosarum*. (a) للمظهر الميكروسكوبي للعقد على جذور البزلاء. (b) صورة مصغرة توضح قطاع طولي في عقدة بزلاء. (c) خلايا البزلاء المقصصة مع البكتيريا المثبتة للنتروجين، (d) بكتيريا محطمة بفشاء حول بكتيريا.

وتعرف خلايا البكتيريا الجذرية *Rhizobium* المنطلقة من العقدة المثبتة للنتروجين بالبكتيرينات *bacteroids*، وبهذه الصورة تنشط عادة البكتيريا جيناتها *nif*، وتفرز الأمونيا الناتجة في النبات العائل، والذي يقوم بتمثيل هضم الأمونيا بتكثيفها بحمض جلتاميك لتكوين الجلتامين، ومن ثم يستخدم الجلتامين في توزيع النتروجين المثبت إلى بقية أجزاء النبات.

وغالباً ما تظهر العلاقة التكافلية بين البقل، والبكتيريا الجذرية تخصص لسلسلة عوائل، وهناك أنواع بقولية معينة لا تكون عقداً إلا مع أنواع معينة من البكتيريا (جدول ٩-٢)، وبالنسبة لبعض البكتيريا التي تشمل على

R.phaseoli و R.trifolii و R.leguminosarum، التى تكون عقدًا فى البازلاء والبرسيم واللوبيا الذهبية على التوالى، يبدو أن سلسلة العائل البكتيرية هى السمة الوحيدة التى تميز الأنواع المختلفة.

وهناك أنواع بكتيريا جذرية أخرى بها الكثير من الاختلافات الكيميائية الأساسية، بالإضافة إلى تنوع تخصص سلسلة العائل، ويتعلق المثال الأكثر لفتاً للنظر فى التمييز ما بين الأنواع سريعة النمو والأنواع البطيئة النمو، وعلى أساس الخصائص البيوكيميائية وبماتلات الـ د.ن.أ، فلهذين المجموعتين تشابهات قليلة جداً بخلاف قدرتهما على تكوين العقد فى البقوليات، ولهذا السبب، صنفت الأنواع البطيئة النمو فى الآونة الأخيرة على أنها أعضاء جنس جديد، Bradyrhizobium، والذى يعنى حرفياً بكتيريا جذرية بطيئة، وبغض النظر عن هذه الاختلافات، فإن أى عقدة مثبتة للنتروجين، يمكن أن تتشابه تماماً، بغض النظر عما إذا كانت ناتجة عن الأنواع سريعة النمو أو الأنواع البطيئة النمو.

جدول ٩-٢ أنواع بكتيريا جذرية منتخبة وعوائلها النباتية

النوع البكتيرى	النبات العائل	تعليق
Rhizobium	Peas, Vicia (Broad bean)	أنواع مرتبطة ارتباطاً شديداً ببعضها البعض
Leguminosarum	lentils	
R.trifolii	Clover	
R.phaseoli	Phaseolus bean	
R.loti	Lotus	يكون اللوتس عقد أيضاً بواسطة براويرازيوم
R.lupinii	Lupin	
R.meliloti	Alfalfa	
R.sesbania	Sesbania	يحدث عقد بالجذر والساق على سبائنا ويثبت النتروجين أيضاً فى المثبت الذى ينمو بصورة طليقة
R.fraedii	Soybean	يحدث عقد غير ثابتة فى معظم مثبتات فول الصويا
Bradyrhizobium Japonicum	Soybean	تثبت بعض السلالات النتروجين الذى ينمو بصورة طليقة
B."cowpea miscellany	يكون عقد فى العديد من التبويضات الموارية التي تضم كابوى وأيضاً الباراسبوتيوم غير البقولى	له القدرة على تكوين عقد فى عائل غير بقولى

ومما لا يثير الدهشة، فإن التخليق الشكلى الذى يحدث أثناء تطور العقدة، ينعكس على المستوى البيوكيمائى، وأحد الأمثلة الواضحة فى البكتيريا الجذرية هو نشاط جينات *nif*، ولكن عند مقارنة كل بروتينات البكتيريا التى تعيش معية حرة ببروتينات البكتريينات، يكشف عن وجود مجموعة بروتينية

مختلفة تماماً فى كلتا الحالتين، فالعديد من الجينات التى يخمد نشاطها فى الخلايا البكتيرية الحرة تكون نشطة فى البكتيرينات والعكس صحيح.

ويظهر التكوين البيوكيميائى للبروتينات الذى تصنعه عقدة النبات أيضاً تغيرات كبيرة بالمقارنة بالتكوين الكيميائى للبروتينات فى الجذور الغير مصابة، فهناك ما لا يقل عن ٥٠ بروتيناً جديداً تسمى nodulins قد تم الكشف عنها بشكل مفصل فى العقدة، وقد يكون مجموع البروتينات المحددة للعقدة أضعاف هذا الرقم، ولا يعرف إلا وظائف القليل من هذه nodulins، والبعض، مثل إنزيمات الجلتامين سينساز واليوركاز، إنزيمات يتطلبها التمثيل الهضمى للأمونيا، ويقوم الـ nodulin الأكثر وفرة، الهيموجلوبين البقولى، بنقل الأكسجين إلى البكتيرينات المثبتة للنتروجين.

ويضيف (الهيموجلوبين البقولى) صفة اللون الوردى على العقد المثبتة للنتروجين (شكل ٩-١١ و ٩-١٢). ويوجد هذا البروتين على وجه الحصر فى سيتوبلازم الخلية النباتية، لكنه إلى حد ما يعتبر العالم الأصغر microcosm لعملية التكافل، وتحدد مجموعة العوامل الوراثية للعائل، الجزء البروتينى من جزيء الهيموجلوبين البقولى، بينما تصنع البكتيرية جزء الـ haem، وعلى الرغم من أنه يعتقد بصورة شائعة أن الهيموجلوبين البقولى يحمى النتروجيناز من التلف، إلا أن وظيفته الأساسية هى توصيل الأكسجين إلى البكتيرينات، التى تحتاج إلى مزيد من الأكسجين للحصول على الطاقة أثناء تثبيت النتروجين، ذلك لأن بيئتها المجاورة تفتقر جداً إليه.

وتتشابه جينات الهيموجلوبين البقولى لفول الصويا بدرجة ملحوظة مع جينات هيموجلوبين الثدييات، وعلاوة على ذلك، تحتوى العقد الجذرية المتكونة على

النباتات غير البقولية بواسطة بكتيريا Frankia أيضاً على الهيموجلوبين البقولي، وتثير هذه المكتشفات تساؤلات عن التاريخ الارتقائي للجزء، هل كان موجوداً في الأصل في جميع النباتات، لكنه فقد بعد ذلك من معظمها؟ وهل ينشأ بشكل مستقل في مجموعات نباتية مختلفة؟ وإذا كان الأمر كذلك، هل كان هذا النشوء بالطرق التقليدية، أو هل يمثل الهيموجلوبين البقولي إحدى إبداعات الطبيعة المبدلة؟ بمعنى، هل انتقل جين الهيموجلوبين البقولي بطريقة ما من حيوان ثديي بدائي إلى نبات؟ لا تزال هذه الأسئلة تبحث عن إجابات، كذلك الأسئلة الخاصة باستجابة البقوليات للإصابة بالبكتيريا الجذرية .

التحليل الوراثي للبكتيريا الجذرية

Genetic analysis of Rhizobium bacteria

البكتيريا الجذرية من أنواع البكتيريا الأكثر بساطة وقبولاً للتحليل الوراثي عن عوائلها من النباتات البقولية، فليس من المدهش والحال كذلك، أن يكون التقدم في تمييز الجينات البكتيرية المطلوبة لتثبيت النيتروجين التكافلي وتكوين العقد سريع جداً عن التقدم الحادث في تمييز جينات النبات التي تساهم في هذه الأنشطة، وعلاوة على ذلك، فقد ساعد إلى حد كبير، عزل جينات *nif* في بكتيريا كليبسلا الرئوية على تمييز الجينات المماثلة في البكتيريا الجذرية، والتسلسلات النكليوتيدية لجينات *nif* من بكتيريا مختلفة متشابهة تماماً لدرجة أن جينات بكتيريا كليبسلا الرئوية يمكن أن تستخدم كمجسات للبحث عن جينات *nif* في الأنواع الأخرى.

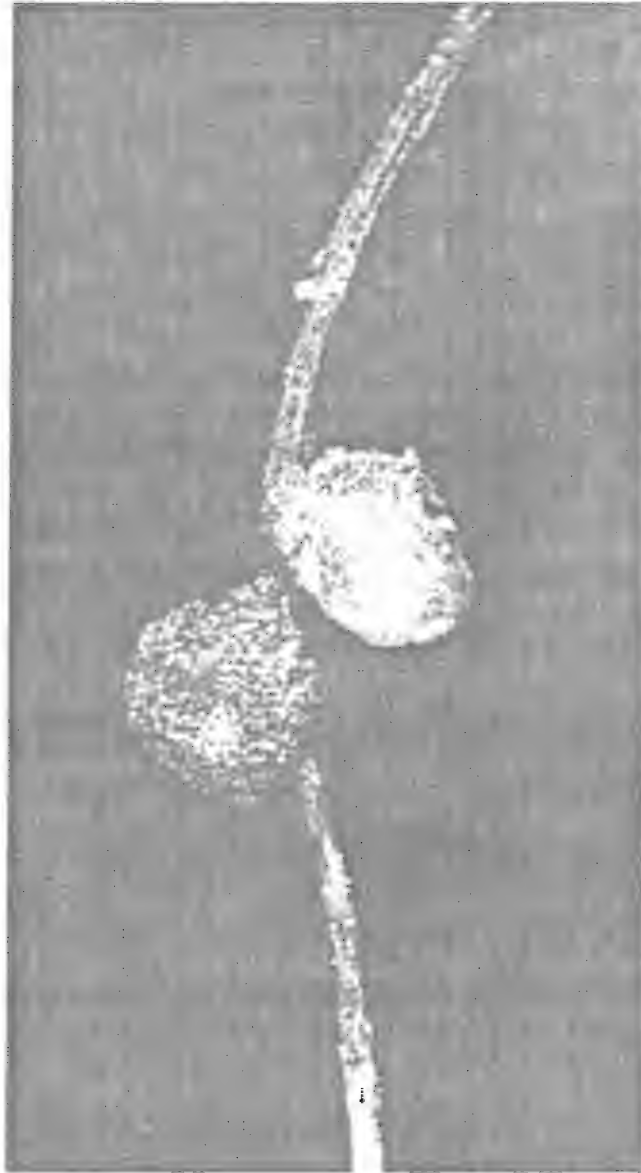
وباستخدام هذا الأسلوب، أوضح الباحثون بما فيهم فرانك كانون وزملاؤه في مجموعة ساسكس، أن جينات *nif* للبكتيريا الجذرية سريعة النمو، تقع في بلازميدات كبيرة تسمى بلازميدات تكافلية (شكل ٩-١٣)، وتحتوى نفس البلازميدات أيضاً على جينات *nod*، التى تحتاجها البكتيريا للحث على تكوين العقد بواسطة النبات العائل، وتقع جينات *nif* و *nod* على كروموسوم بكتيرى فى بكتيريا *Bradyrhizobium*.

والسؤال البالغ الأهمية حالياً فيما يخص جينات *nif* فى البكتيريا الجذرية هو لماذا لا تعبر هذه الجينات إلا فى العقد ولا تعبر فى البكتيريا فى حالة معيشتها الحرة بعيدة عن العائل النباتى، وتعتبر مجموعة العوامل المنظمة التى تؤثر على تعبير جينات *nif* فى الأنواع الريزوبومية مشابهة تماماً لمجموعة العوامل المنظمة فى بكتيريا كليبسلا الرئوية، وقد أوضح الباحثون فى معمل أسبل وباحثون آخرون فى أنثرو جونستون فى معهد جون انيس فى نوريش بانجلترا، وفى هانك هينيك فى Eidgenössische Technische Hochschule فى زيورخ بسويسرا، أن الأنواع *R. leguminosarum* و *R. meliloti* و *R. japonicum* لهـ جينات متشابهة فى التسلسل للجين التنظيمى *nifA* لبكتيريا *K. pneumoniae*. بالإضافة إلى ذلك، فإن محرضات *nif* فى بكتيريا *Rhizobium* و *Klebsiella* لهـ تسلسلات متشابهة، وفى حقيقة الأمر، فإن النسخ من محرضات *nif* فى البكتيريا الجذرية يمكن أن ينشطه منتج جين *nifA* لبكتيريا كليبسلا الرئوية. وهذه التشابهات، على الرغم من أنها تقلل تماماً تركيز الأكسجين والأمونيا فى وسط نمو بكتيريا كليبسلا الرئوية، فإنها تنشط على الفور تثبيث النتروجين فى هذا الكائن العضوى، لكنها ليس بذات تأثير على تثبيث النتروجين فى معظم البكتيريا

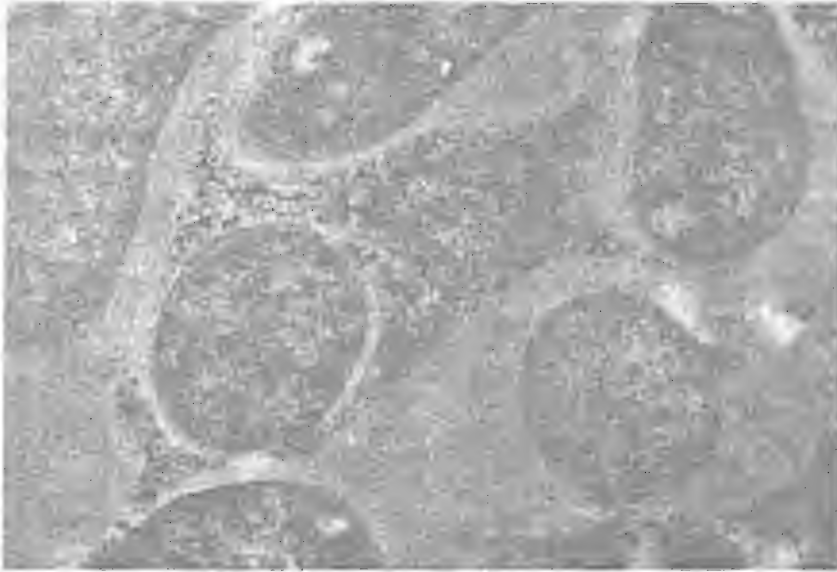
الجزرية ، ولا تزال تمثل المكونات الخاصة في العقد الجزرية التي تتحليل على البكتيريا الجزرية لكي تنسخ جينات الـ *nif*، أحد الأشياء المجهولة في أبحاث تثبيت النتروجين.

وعلى الرغم من أن التعرف على العديد من جينات *nif* في البكتيريا الجزرية قد أصبح يسيراً جداً من خلال استخدام المعلومات المتاحة من بكتيريا كليبسلا الرئوية ، فلم تجد البكتيريا غير التكافلية المثبتة للنتروجين أية مساعدة، عند القيام بتحليل الجينات المطلوبة لتكوين العقد، فلا بد وأن يبدأ العمل مع البكتيريا الجزرية من الصفر.

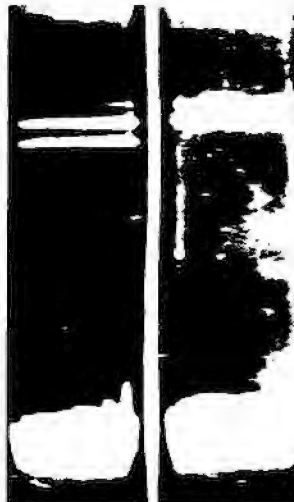
وسطح البكتيريا الجزرية ،الذى يجب أن يلامس في إحدى النقاط جذر النبات العائل، من المتوقع أن يكون محدداً مهماً في تكون العقد والتخصص. وقد ظهر هذا إلى حد ما من خلال الدلالة الوراثية، فبعض الطفرات التي فشلت في صنع بوليمار خارج الخلية، يسمى بـ *exopolysaccharide*، لا تستطيع أيضاً أن تكون عقد لنباتاتها العائلة الطبيعية (شكل ٩-١٤) ، ومع ذلك، فالمسألة ليست بهذه البساطة ، فالسلالات الطافرة الأخرى التي ينقصها عديد السكريات الخارجى *exopolysaccharide* ، تستطيع تكوين العقد ولكنها لا تستطيع أن تثبت النتروجين، ويبدو أن أنواع أخرى لا تزال غير تالفة، سواء في تكوين العقد أو في تثبيت النتروجين، وقد تعكس هذه التغييرات حتى الآن، المهارات المجهولة في التفاعل بين *exopolysaccharide* والنبات العائل.



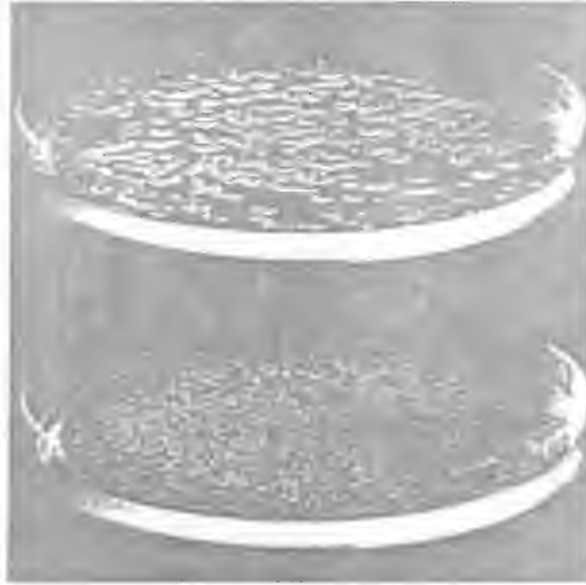
شكل ٩-١١ العقد المثبتة و غير المثبتة للتروجين على جذر نبات بقرلاء، فقد لقيح نبات البقرلاء بمسللتين من *R. leguminosarum* . واستطاعت إحداهما أن تثبت النتروجين، وأخرجت عقدا وريدية اللون تحتوى على الهيموجلوبين البقولى . ولم تستطع السلالة الأخرى أن تثبت النتروجين بونتيجة لذلك تظهر العقدة شاحبة جدا لاحتوائها على كميات صغيرة جدا من الهيموجلوبين البقولى .



شكل ١٢-٩ تمركز الهيموجلوبين البقولي في سيتوبلازم الخلية النباتية ، وقطعت عقدة بلزلاء مثبتة للنتروجين إلى قطاعات رقيقة جدا، التي كانت تسيح في جسم مضاد محدد للهيموجلوبين البقولي ، وبعد ذلك وسم الجسم المضاد بجسيمات من الذهب، التي تظهر كنقاط داكنة، ووجدت التغطى قاصرة على سيتوبلازم النبات، وغير موجودة في اليكترينيات، أو الفراغ المحيط بها.



شكل ١٣-٩ تصور لبلارميد تكافى من نوع *R. leguminosarum* . تم استخراج بلارميد د.ن.١ من خلايا أحد الأنواع اليكتيرية البرية (الصورة اليسرى) ومن ظافر غير مكون للعقد (الصورة اليمنى). وقد أظهر فصل بلارميدات مختلفة بواسطة الهجرة الكهربائية على جل من الأجلوز، أن النوع اليكتير البرى ثلاث بلارميدات، بينما فقد الظافر البلارميد الأصفر، البلارميد المكافى.



شكل ٩-١١ مظهر طافر من بكتيريا *R. leguminosarum* التي لا يوجد بها عديد السكريات الخارجية *exopolysaccharide* بصورة سليمة، ويوضح الطبق العلوي سلالة النوع البري، ويحتوى الطبق السفلى على طافر لم يعد يصنع عديد سكريات خارجية ولا يكون عقد على جذور البازلاء.

وكما ذكرنا من قبل، فإن نفس البلازميدات الكبيرة التي تحمل جينات *nif* لأنواع البكتيريا الريزوبومية سريعة النمو، تحتوى أيضاً على عناقيد من جينات *nod*، تسهم في تكوين العقد، وقد أوضح العديد من الباحثين أن نقل الـ *nod* إلى المحتوى على جينات *nod* من بكتيريا *R. leguminosarum* التي تكون العقد في البازلاء، إلى بكتيريا جذرية أخرى، تكون العقد بصورة طبيعية في البرسيم أو الفول، يكسب البكتيريا المستقبلة القدرة على تكوين العقد في البازلاء.

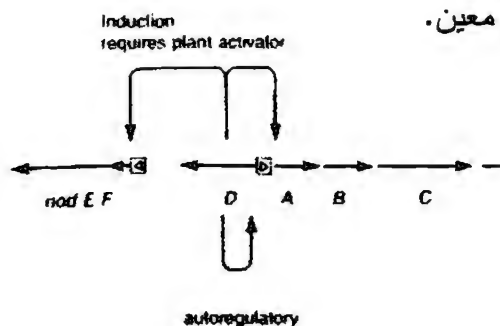
إلا أن ذلك لا يعنى أن عنقود بلازميد *nod*، هو كل ما تحتاجه البكتيريا الجذرية لتكوين العقد، فالبكتيريا من جنس البكتيريا الزراعية وثيقة الصلة بالبكتيريا الجذرية، بالرغم من أن أنواع البكتيريا الزراعية ليست لها قدرات على تكوين العقد، أو تثبيت النتروجين، وبإدخال جينات *nod* لبكتيريا

R.leguminosarum فى خلايا البكتيريا الزراعية لا يعطى البكتيريا القدرة على تكوين العقد الطبيعية فى جذور البازلاء، بالرغم من أنها تحدث "عقد كاذبة" تكون خالية من البكتيرينيات، وتظهر النتيجة أنه يجب أن تحتوى بكتيريا *R.leguminosarum* على جينات إضافية من أجل ظهور العقد الطبيعية، لكنها غير موجودة فى أنواع البكتيريا الزراعية .

وقد كشف تحليل عنقود جين *nod* الجذرى عن بعض الحقائق المتعلقة بوظائف الجينات وتنظيمها ، واشتملت مجموعات البحث التى شاركت فى هذا العمل مجموعة من جونستون، وآدم كوندروسي من مركز الأبحاث البيولوجية الأكاديمية المجرية للعلوم فى Szeged ، و شارون لونج من جامعة ستانفورد فى بالو ألتو بكاليفورنيا، وبارى رولف من الجامعة الوطنية الأسترالية فى كنبره.

وقد تم التعرف على ثمانى جينات فى العنقود ،وسميت بأسماء *nodA* إلى *nodF* و *nodI* و *nodJ* (شكل ٩-١٥ ، وجدول ٩-٣). وتبطل الطفرات الموجودة فى الجينات *nodD* و *A* و *B* و *C* تكوين العقد، فى حين تؤخر الطفرات الموجودة فى الجينات الأربعة الأخرى فقط بدء نمو العقدة، وتقلل الأعداد المتكونة، وعلى الرغم من الاختلافات الموجودة فى تخصصات سلسلة العائل للأنواع الجذرية العديدة، فإن جيناتها *nod* المناظرة، تتشابه فى التسلسل والموقع والوظيفة، ويعد هذا التشابه ميزة، لأن استنتاج دور جين *nod* معين فى أحد الأنواع، قد يمكن استقراؤه لإعطاء معلومات عن وظيفته فى الأنواع الأخرى. وتتسخ جينات *nodA* و *nodB* و *nodC* و *nodI* و *nodJ* كوحدة واحدة، ويظهر أنها تحدد بروتينات مصاحبة للغشاء البكتيرى، فجين *nodI* يشفر عن بروتين قد يكون مرتبطا بنقل الغشاء، على الرغم من عدم معرفة هوية المادة التى قد يحملها عبر الغشاء ،

تتسخ جينات *nodE* و *nodF* أيضاً مع بعضهما، ويعتبر جين *nodE* مشابه للبروتين الحامل للأسيل، ذلك البروتين الذى يسهم فى تخليق الأحماض الدهنية، وسواء كان جين *nodF* مرتبطاً أيضاً بعملية تخليق الدهن، فلا يزال هذا الأمر مجهولاً، وقد يساعد جين *nodE* على منع تكون العقد فى البقوليات، فضلاً عن العائل الطبيعي لنوع جذرى معين.



شكل ٩-١٥ تمثيل جينات *nod* لبكتيريا *R. leguminosarum*، والطريقة التى تنتظم بها، وقد وضحت أبعاد واتجاهات نسخ جينات *nod* للشعافية، وتظهر المناطق المنظمة فى صورة مثلثات داخل مربعات، وينظم جين *nodD* نسخه فى وسط مصفر فى حين يتطلب تنشيط جينات *nod* الأخرى عوامل (الفلافونيك والفلافونيك) من البزلاء، بالإضافة إلى منتج جين *nodD*.

جدول ٩-٣ خصائص جينات تكوين العقد فى البكتيريا الجذرية

الجين	طول المنتج الجينى (كيلو دالتون)	تأثير الطفرة على دور المنتج الجينى
NodA	١٨	Nod-Rhc- مرتبط بالغشاء
NodB	٢٣	-- Nod-Rhc-
NodC	٤٦	Nod-Rhc- مرتبط بالغشاء
NodI	٣٤	Nod delay نقل البروتين؟
NodJ	٢٧	Nod delay مرتبط بالغشاء؟
NodD	٣٤	Nod-Rhc- تنظيم
Nod F	١٠	Nod delay يشابه حامل البروتين أسيل
NodE	٤٨	-- Nod delay

-Nod a فشلت فى تكوين عقد؛ Rhc- فشلت فى قتل الشعريات الجذرية.

تنظيم تعبير جين نود

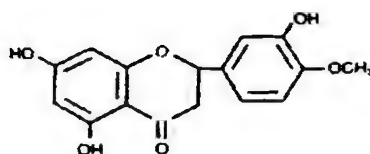
Regulation of nod gene expression

وتبين أن آخر جينات الـ nod هذه، جين nodD، أنه من الجينات المنظمة، حيث يتحكم في نسخ كلاً من نفسه وجينات nod الأخرى الموجودة في المجموعة، وعندما تحفظ البكتيريا الجذرية في وسط استزراع مصغر، يعبر الجين nodD بمستويات عالية، بينما لا تنسخ جينات nod الباقية، ومع ذلك، فقد وجد اختلاف مثير، عندما تعرضت الخلايا البكتيرية إلى نتح جذور البازلاء أو البرسيم أو البرسيم الحجازي، فقد ازداد حينئذ نسخ جميع جينات nod، ماعدا جين nodD بحوالى ٧٠ ضعفاً.

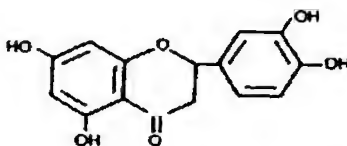
يعتمد هذا التأثير على وجود جين nodD نشط، تلك النتيجة التى توضح أن لجين nodD دوراً منظماً. فأحدى المواد الموجودة فى الجذر، تفرز وتؤثر من خلال الجين nodD، لإحداث نسخ نشط لجينات nod الأخرى، فمن الاتجاه العكسى لبداية كل من جينات nodA و B و C و I و J وجينات nodF و E، تكون الوحدات المنظمة ناقصة، قطعة دن. أ المحتفظة التى قد تكون مرتبطة فى عملية تنظيمها، ويتعرض جين nodD نفسه، على الأقل فى بكتيريا *R. leguminosarum* للتنظيم السلبي من خلال منتجه، والذي ترفض تركيزاته العالية نسخ الجين.

وبتحليل إفراز جذور نباتات البازلاء والبرسيم الحجازي، تم التعرف على العديد من مركبات الوزن الجزيئى المنخفض، التى تستطيع تنشيط نسخ

جينات nod، والجزيئات هي مركبات من نوع الفلافين^٢ flavone أو الفلافانون flavanone (شكل ٩-١٦). ووجد أن للمركبات المتوفرة تجارياً من هذه الفئات القدرة على الحث على تنشيط جينات nod.



5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone
(hesperetin)



5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanone
(eriodictyol)

شكل ٩-١٦ التركيب الكيميائي لاثنتين من الفلافونويدات، التي تنشط نسخ جين nod

وعلى الرغم من معرفة الكثير عن موقع وتركيب الجينات التي تسهم في عملية تكوين العقد وتثبيت النتروجين، إلا أنه لا يزال هناك الكثير المطلوب القيام به لترجمة المعلومات المجمعة على مستوى د.ن.أ إلى فهم حقيقى للكيمياء الحيوية وبيولوجيا الإصابة بالبكتيريا الجذرية، فالتحليل الجزيئى للعلاقة التكافلية بين البكتيريا الجذرية والبقول، قد يكون لها أبعاد كثيرة، تختلف تماماً عن أهمية التفاعل ذاته .

^٢ - الفلافين: مركب بلورى لا لون له، ولا يذوب فى الماء، ويعتبر المادة الأصلية لمجموعة أصباغ صفراء. (المترجم)

ويمكن النظر إلى البكتريا الجذرية والكائنات العضوية الأخرى، التى تشترك فى عمليات معقدة مع النباتات، سواء أكانت هذه العمليات تكافلية أو محدثة للأمراض، على أنها تثير استجابات كيميائية حيوية وشكلية معينة للنبات العائل، وإذا أمكن تأسيس الآلية الدقيقة التى تحدث بها البكتيريا الجذرية تنقافاً لشعيرات الجذور، وتكون إصابة الخيوط ، وانقسام الخلايا الجذرية، فقد تؤدى المعلومات إلى فهم أفضل لكيفية تحديد نمو وتخليق الخلايا النباتية والأعضاء بصفة عامة.

سماد نتروجينى بسعر خيالى: كيف يمكن تحقيق هذا الحلم؟

Cost-free nitrogen fertilizer: how real a prospect?

تشمل دراسة التثبيت البيولوجى للنتروجين سلسلة من النظم العلمية، التى تتراوح ما بين الكيمياء غير العضوية إلى علم الإنزيمات، والفسىولوجية الميكروبية، والوراثة الجزيئية، والتفاعلات ما بين الميكروب والنبات، إلى علمى الزراعة والبيئة، أين يمكننا أن نبحث فى هذه المتعددة الجهود عن التطورات التى ستقدم فى المستقبل مصادر النتروجين المثبت لتغذية النبات، الذى سيكون أكثر قبولا على المستوى الاقتصادى والاجتماعى والبيئى عن الاعتماد الحالى المتقل على الأسمدة التجارية؟ أى من هذه التكهّنات التى يمكن اعتبارها "شطحات من الخيال"، وأيها التى نحمل آمالاً حقيقية يمكن أن تتحقق ؟

تلقى الكيمياء والكيمياء الحيوية لتثبيت النتروجين حالياً اهتماماً أقل مما يفترض أن تستحقه مقارنة بمجالات البيولوجيا والوراثة الجزيئية المتعارف عليها، وبالنسبة للنتروجيناز، حبت الطبيعة العالم بإنزيم يختزل النتروجين عند ضغط جوى وعند درجة حرارة محيطية، ويجب أن يكون توضيح تركيبات

الحفاز المسمى بالعامل المساعد حديد-موليبدينوم لإنزيم النتروجيناز، وكذا الوسائط بين ركيزة النتروجين ومنتج الأمونيا النهائي على قمة أولويات البحث. ويمكن أن تكون الوراثة أداة قوية جداً في هذا البحث ، فالطفرات التى تعرقل تخليق العامل المساعد حديد-موليبدينوم عند مراحل مختلفة متوفرة، ويمكن استخدامها فى توضيح كيف يصنع العامل المساعد، وللمساعدة على وصف تركيبه، وقد تؤدي هذه الدراسات إلى حفازات لإنتاج الأمونيا، لا تحتاج درجات حرارة وضغطا عاليين لاختزال النتروجين ، وربما الأكثر أهمية ، التى تعطى الهيدروجين لتفاعل الاختزال، ليس من غاز الهيدروجين المكلف للطاقة، ولكن من الماء، الذى يعتبر المصدر الهيدروجيني المحتمل للتفاعل الإنزيمى.

وهناك عيبان آخران للنتروجيناز، هما حساسيته المفرطة للأكسجين وميله المسرف لإطلاق غاز الهيدروجين أثناء اختزال النتروجين، وبمعلومية هذه الخصائص كلية الوجود فى جميع الدراسات النتروجينية حتى الآن، فإن هذه الخواص قد تكون مصاحبة بشكل مطلق لنشاط الإنزيم، ولكن أهى كذلك؟ فنسبة عدد الإلكترونات الموجهة نحو تكوين الهيدروجين إلى عدد الإلكترونات المستخدمة فى اختزال النتروجين، ليست دائماً نسبة ثابتة، حيث تتأثر هذه بالوفرة النسبية لركائز التفاعلين ووضع الخلية من الطاقة.

كانت المحاولات لعزل أشكال طافرة من النتروجيناز تكون أقل حساسية للأكسجين محاولات دون المستوى المطلوب ، بالإضافة إلى ذلك، لم يكن هناك الجهد الجاد الموجه نحو الحصول على طفرات من جين *nif* ، التى تحدد بروتينات النتروجيناز التى تطلق هيدروجيناً أقل من سلالات النوع البرى، وعلى الرغم من وجود نظم "امتصاص الهيدروجين" فى بعض سلالات من البكتيريا الجذرية يمكنها إعادة دوران الهيدروجين بصورة نشطة، واستخدام الطاقة التى تحل محله لتثبيت النتروجين، إلا أن التلقيح بهذه السلالات لم يضيف

حتى الآن سوى تأثيرات غامضة على نمو النبات، وسواء كان يمكن أن يتحسن نيتروجيناز بالنسبة إلى الهيدروجين ومشاكل الأكسجين أم لا ، لا يمكن التنبؤ به. - غير أن هذه الطريقة لم تلق الاهتمام الكافي حتى الآن.

وتتضمن استراتيجية أخرى لتحسين التثبيت البيولوجي للنيتروجين ، معالجة ، واستغلال الميكروبات غير التكافلية المثبتة للنيتروجين ، مثل طحالب *Anabaena* لزرقاء-الخضراء ، حيث تحتفظ كل من هذه الكائنات العضوية بالأمونيا التي تثبتها بصورة مستمرة، وتمثلها هضماً إلى أحماض أمينية وبروتينات بمجرد أن تصنعها، ومع ذلك، فقد تم عزل طفرات من *Anabaena* التي تحرر بعض أو كل النيتروجين المثبت ، فإذا أمكن استخدام هذه الطفرات فيما بعد في إنتاج سلالات جديدة ذات معدلات تثبيت نيتروجين متزايدة، فقد يمكن إضافة هذه الطحالب الزرقاء-الخضراء في مياه الري وتعطي نتائج مفيدة ، وتكون هذه الاستراتيجية أكثر ملاءمة في مناطق العالم التي يتوفر بها ضوء كاف من الشمس، وستكون جذابة على وجه الخصوص في المناطق التي تعتمد على مستويات الزراعة، يكون فيها أى إضافة من الأمونيا، أفضل مما هو سائد حالياً، أى لا شيء على الإطلاق.

وهناك مجموعة ثانية من البكتيريا غير التكافلية المثبتة للنيتروجين ، والتي قد تكون أكثر قابلية للاستغلال، وهي البكتيريا التي تعيش على أسطح جذور النباتات. ففي منتصف السبعينات، كان هناك اهتمام مكثف بأحد هذه الكائنات، بكتيريا *Azospirillum* ، بناء على النتائج التي كانت تفترض أن تثبيت النيتروجين بواسطة هذه البكتيريا على جذور الحشائش والذرة والحبوب الأخرى تفيد النباتات العائلة، وقد ترددت ادعاءات بأن الذرة يمكن أن تحصل على الكثير من النيتروجين المثبت بيولوجياً مثل فول الصويا، وأدت الأبحاث التالية في الصوبة الزجاجية والحقل إلى نقصان سريع لهذه التفاعلية، وقد وصلت الأبحاث الجارية

الآن مع بكتيريا *Azospirillum* إلى مستوى متدنٍ، إلا أنه من الممكن في ظل خيبة الأمل الحالية مع الكائن العضوى، أن يصرف النظر تماماً عن هذا الموضوع.

فهذا البكتيريا، قبل كل شيء يثبت النتروجين ويصاحب جذور بعض المحاصيل النباتية الرئيسية في العالم، يجب أن يكون من الممكن الحصول على طفرات *Azospirillum* التي تثبت نتروجين أكثر من سلالات الأنواع البرية، تكون أقل عرضة لرفض تعبير جينات *nif* في وجود النتروجين المثبت، وتكون أكثر قدرة على إطلاق بعض النتروجين التي تثبته بدلاً من تمثيله هضماً في الحال.

ولا يوجد ضامن بأن هذه الطفرات ستضفي أية فوائد على محصول حبوبى. أنها قد تكون، على سبيل المثال، من الوهن بحيث لا يمكنها أن تنافس البكتيريا المتوطنة بالتربة، ومع ذلك، فقد كانت لمحاولات استخدام الوراثة الجزيئية لإنشاء سلالات من بكتيريا تعيش على جذور النبات، ذات قدرات محسنة لتثبيت النتروجين فرصة على أية حال للنجاح، ويجب ألا يقتصر هذا الأسلوب على اختيار أنواع محسنة من البكتيريا المثبتة للنتروجين، فلا يوجد مبرر، لسبب عدم نقل جينات *nif* من بكتيريا كليبسلا الرئوية إلى بكتيريا أخرى تستعمر الجذور بأعداد كبيرة.

وقد تم التعرف حالياً على أن البكتيريا الجذرية هي المساهمة الرئيسية في اقتصاد النتروجين في العديد من نباتات محاصيل العالم الرئيسية، ما هو مستقبل استغلال التكنولوجيا الحيوية في تعزيز التثبيت البيولوجى للنتروجين فى البقوليات؟ بعض التجارب التي قام بها مؤخراً دونالد فيليبس Donald Phillips من جامعة كاليفورنيا في دافيز، على الرغم من أنها من غير المحتمل أن تكون تكنولوجيا عالية، أظهرت أن لدى طرق تربية النباتات التقليدية الكثير الذى يمكن أن تقدمه، وبالاختيار الواضح لنباتات البرسيم الحجازى التي تزدهر عند

تنمو على نتروجين مثبت، وتنمو أيضاً أفضل عند تلقيحها بالبكتيريا الجذرية ، حصل فيليبس وزملاؤه بسرعة على نباتات ذات إنتاجية متزايدة وبروتين عالي، وقدرة على تثبيت النتروجين، وتبين النتائج أنه على الأقل بالنسبة لهذا البقل، لا تعتمد القيود على كمية النتروجين المثبت كثيراً على البكتير بقدر ما تعتمد على للنبات العائل.

وبالرغم من هذا، فقد لا تكون البكتيريا الجذرية موجودة في التربة، أو إذا وجدت، فإنها لا تكون فعالة في تثبيت النتروجين، وفي تلك الحالات، يجرى تلقيح البذور البقولية بالبكتيريا عن طريق دمجها في غلاف بذري، وتقوم عدة هيئات تجارية بتصنيع مثل هذه اللقاح، وفي الواقع، فإن كل عقد فول صويا أمريكا الشمالية تسكنه سلالات بكتيريا جذرية ملقحة، لأن فول الصويا والكائن العضوى التكافلي المثبت للنتروجين، المتوطنان في شرقي آسيا، غير موجودين بصفة عامة في قارة أمريكا الشمالية.

كان استخدام البذور البقولية الملقحة ناجحاً إلى حد كبير ،خصوصاً في المناطق التي لا توجد بها سلالات من البكتيريا الجذرية المحلية، تستطيع أن تلقح البقل المطلوب تلقحه، ومع ذلك، تظهر مشاكل خطيرة عندما توجد هذه البكتيريا ، وبصفة عامة، يبدو أن السلالات الموجودة تتكيف بصورة أفضل لأن تكون عقد في ظل ظروف الحقل الخاصة ، فقد ثبت من الواقع العملي أنه من الصعب جداً الإتيان بسلالات ملقحة لتشغل العقد، ولذلك، تعتبر المنافسة على تكوين العقد صفة مرغوبة لأي بكتيريا جذرية تستخدم للتلقيح .

ولما كانت أسس التنافس البيوكيميائي والوراثي غير معروفة، فليس من الممكن في الوقت الحالي التقرير بأن المعالجة الوراثية يمكن أن توجه إلى صنع سلالة أكثر تنافساً، على أن هذا يمكن أن يتم بصورة تقديرية ،إذا وجدت سلالتان من البكتيريا الجذرية : تثبت إحداها قدرأ كبيراً من النتروجين، ولكن لا تكون

متنافسة على تكوين العقد، وينطبق على الأخرى العكس صحيح، فمجرد نقل د.ن.أ من سلالة منافسة لأخرى يخلق هجيناً، أى يكون كلاهما منافساً ومثبتاً نتروجينياً فعالاً، ويمكن أن يحدث هذا، حتى لو كانت الطبيعة الدقيقة للجين المنقول أو الجينات غير معروفة.

وهناك أسلوب آخر لمشكلة التنافس، يمكنه أن يستغل التنوع الوراثة فى العائل البقلى بالإضافة إلى التنوع الوراثة الموجود فى البكتير، وعلى سبيل المثال، هناك سلالة بدائية من البازلاء تسمى بالنوع الأفغانى، فشلت فى تكوين عقد بواسطة معظم سلالات *R.leguminosarum*، وهو البكتير التكافلى الطبيعى للباذلاء، وتتحدد مقاومة النبات لتكوين العقد بجين واحد متحى، ومع ذلك، فهناك سلالة *R.leguminosarum* معينة، التى تم عزلها من تربة تركية، تكون العقد فى باذلاء النوع الأفغانى، بالإضافة إلى السلالات التجارية العادية، ويرجع امتداد سلسلة العائل للبكتير التركى، إلى وجود جين واحد، فعندما ينقل هذا الجين إلى سلالة عادية من بكتيريا *R.leguminosarum*، فإنه يكسبها القدرة على تكوين العقد فى نوع البازلاء الأفغانى.

وتوحى هذه النتائج بأنه من الممكن من الناحية النظرية على الأقل تفادى مشكلة التنافس، عن طريق المعالجة الوراثية للنبات البقلى والبكتيريا الجذرية المكونة للعقد، وأولى الخطوات هى إدخال جين مقاومة تكوين عقد البازلاء الأفغانية فى سلالة باذلاء تجارية، والخطوة الثانية، هى نقل جينات سلسلة العائل للسلالة التركية من بكتيريا *R.leguminosarum* إلى سلالة تجارية نشطة من هذا البكتير، يمكنها أن تستخدم حينئذ فى تلقيح النبات المعدل، ويمنع وجود جين المقاومة فى النبات المحصولى تكوين العقد، التى تقوم بها مجموعة البكتيريا *R.leguminosarum* المتوطنة فى التربة، وعلى ذلك يقتصر شغل العقد

على السلالة البكتيرية الملقحة ذات السلسلة الممتدة من العوائل، ويمكن أن يطبق هذا الأسلوب بصفة عامة على الأنواع البقولية والجزرية الأخرى. ومن الأفكار المقنعة الأكثر شيوعاً المعنية بتطبيق الأبحاث على تثبيت النتروجين البيولوجي، ربما تكون الأكثر إثارة- هي تطوير نباتات المحاصيل غير البقولية المثبتة للنتروجين، ويمكن تصور اثنين من السيناريوهات العامة لإنشاء هذه الكائنات العضوية الرائعة، في السيناريو الأول، تطعيم جذور نباتات البطاطس والذرة والطباق بعقد جذرية تسكنها البكتيريا الجزرية المثبتة للنتروجين، والسيناريو الثاني، غرز جينات nif بشكل مباشر في مجموعة العوامل الوراثية للنبات العائل.

واحتمالية إجراء هندسة وراثية للنباتات غير البقولية التي يمكنها تكوين العقد المثبتة للنتروجين احتمالية ضعيفة تماماً، فلا يعرف إلا القليل عن إسهام النبات في تطوير العلاقة التكافلية مع البكتيريا الجزرية ، ولكن كما ذكرنا من قبل ، فإن عشرينات بل مئات الجينات النباتية تنشط بطريقة معينة داخل العقد، وبرغم كل إمكانيات البيولوجيا الجزيئية والقدرة الإنمائية لإدخال جينات جديدة داخل النباتات (انظر الفصل الحادي عشر)، فيبدو أن هناك آمالاً محدودة لإدخال كل هذه الجينات المحددة للعقد في النباتات غير البقولية، وجعلها تعبر بطريقة محكمة ومنسقة.

وفي المقابل، بدا أنه ليس هناك مبرر فني لعدم إمكانية إدخال جينات nif من بكتيريا كليبسلا الرئوية في النباتات وتعبيرها هناك، وعلى الرغم من أن هذا العمل سيكون مضيعة للوقت، إلا أنه يمكن إقران الوحدات النسخية لجين nif بتسلسلات منظمة تسمح بتعبيرها في النباتات، ويمكن وضع هذه الوحدات الإنشائية بعد ذلك في متجه مثل Ti plasmid في بكتيريا الأورام

الزراعي *Agrobacterium tumefaciens*، الذى يمكن استخدامه فى إدخال الجينات إلى مجموعة العوامل الوراثية لنبات سهل الانقياد، ومع ذلك، يعتبر هذا الجزء السهل.

ويجب أن يكون تنظيم جينات *nif* تنظيمًا دقيقًا بحيث تصنع منتجاتها العديدة بالنسب المضبوطة، بينما ما هو أهم من ذلك، أن تؤخذ فى الاعتبار، التأثيرات السامة للأكسجين على النتروجيناز التى تسبب مشكلة رئيسة، وستعتبر هذه الجينات إلى حد ما فى نبات ذا تركيز قليل من الأكسجين، وتحتوى أنسجة كهذه على أجزاء رئيسة من أعضاء تخزين كبيرة (درنات البطاطس، على سبيل المثال) داخل البذور المنبئة ومناطق الجذور، وعلى ذلك، فمن المفضل جعل جينات *nif* المعبر عنها من التسلسلات المنظمة أن تنشط فى هذه الأنسجة النباتية اللاهوائية.

وعلى الرغم من القيام بهذه الأنشطة، فلا يزال هناك أشياء أخرى لا يمكن تقديرها بدقة، هل سيتجمع إنزيم مركب نتروجيناز بصورة صحيحة فى البيئة الغريبة؟ هل الأمونيا التى ستنتج، يمكن أن تمثل هضماً فى نفس المكان؟ إن لم يحدث هذا، فيحتمل أن تتسرب للخارج، وأخيراً، وحتى مع نجاح تثبيت النتروجين، هل ستكون متطلبات الطاقة كبيرة جداً، بحيث تقلل غلة النبات إلى مستويات غير مقبولة؟ هذه الأسئلة وأسئلة أخرى يجب أن توضع فى الاعتبار، والشئ المثير هو، إن البيولوجيا الجزيئية للنبات قد تطورت بسرعة خلال السنوات القليلة الماضية، حتى أن البروتوكولات التجريبية لدراسة هذه الأسئلة، ستكون قريباً فى متناول المختصين.

الفصل العاشر

زراعة الخلايا والأنسجة النباتية

Plant cell and tissue culture

تعد زراعة الخلايا والأنسجة النباتية عنصراً بالغ الأهمية في معظم أوجه التكنولوجيا الحيوية النباتية، إذ تعتمد سلسلة كبيرة من التطبيقات النباتية على قدرة الخلايا والأنسجة النباتية على النمو في محاليل غذائية بسيطة معروفة التركيب ، وتشمل هذه التطبيقات تكاثر النبات plant propagation، وحفظ وتخزين البروتوبلازم الجرثومي (الأصل الوراقى للمادة النباتية)، الذى يعول عليه فى الاحتفاظ بمجاميع جينات النباتات التى لا تكون فى حالة زراعة نشطة، وإنتاج المواد الكيميائية المفيدة من الناحية التجارية، والهندسة الوراثية النباتية plant genetic engineering.

وترجع أصول طرق استزراع الخلية النباتية إلى أوائل القرن العشرين، عندما أوضح جوتليب هابرلاندت Gottlieb Haberlandt، أنه يمكن الاحتفاظ بأنواع معينة من الخلايا النباتية فى ظروف صحية جيدة فى مزرعة، وعلى الرغم من أن الخلايا لم تنقسم إلا أن أبحاث Gottlieb Haberlandt قد حددت معالم الطريق للأبحاث التى ستأتى فى المستقبل.

إلا أن عدم القدرة على جعل الخلايا النباتية المستزرعة تنقسم ظل الشغل الشاغل لسنوات عديدة، ولم تدخل طرق العلم المنهجية العصر الحديث إلا فى فترة الخمسينات، وفى منتصف هذا العقد، اكتشف فولك سكوج Folke Skoog من جامعة ويسكونسن فى ماديسون، السيبتوكينينات cytokinins، وهى مجموعة من

الهرمونات النباتية لها عدة تأثيرات مختلفة، تشمل تحفيز انقسام الخلية، بالإضافة إلى ذلك، فقد وجد روبرت جوثريت Robert Gautheret من جامعة بيار وماري كوري في باريس بفرنسا، أن الأوكسينات^١ auxins، هي مجموعة أخرى من الهرمونات النباتية تحفز على انقسام خلايا الكالوس^٢، والكالوس كتلة غير متميزة من الخلايا تتكون على جرح النبات، وتنتج أيضاً الأنسجة النباتية في مزارع الأنسجة (شكل ١٠-١).

^١ - أوكسين: هرمون النمو، اصطلاح عام يطلق على مواد عضوية لها تأثير موات أو غير موات لنمو النباتات، وذلك عندما تكون تلك المواد في تراكيز خفيفة، (معجم المصطلحات الزراعية للشهابي). المترجم

^٢ - الكالاس: نسيج ينمو بعد جرح يحصل في الشجرة ويفضى إلى تغطية ذلك الجرح، (معجم سابق ذكره). المترجم



شكل ١٠-١ لزراعة نسوج كاكوس من صنف ظماطم برى، تبدأ النباتات في التجدد من خلايا كاكوس

وبإضافة السيبتوكينينات والأوكسينات إلى وسط النمو، الذى يحتوى أيضاً على الأملاح والسكر، أصبح فى مقدور الباحثون زراعة الخلايا النباتية فى المزرعة، وليس مجرد الاحتفاظ بها هناك، وقد تعلموا أيضاً، أنه فى العديد من الحالات، يمكن تجديد النبات كله من الكالوس أو من الأنواع الأخرى من الخلايا النباتية التى تنقسم فى المزرعة، وتعتبر القدرة على تجديد النباتات شرطاً أساسياً فى العديد من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية للنباتات الجارى فحصها .

وفى مقالة نشرت فى عام ١٩٥٨، كتب كل من ألبرت ريكير Albert Riker وألبرت هلدبرانت Albert Hilderbrandt من جامعة ويسكونسن، أن طرق استزراع الخلية النباتية فتحت الطريق أمام العديد من الأبحاث التطبيقية والأساسية للنباتات، ويمكن البدء فى تطبيق الأساليب التى استخدمت بنجاح فى دراسة الوراثة الجزيئية للكائنات المجهرية على أنسجة الخلايا النباتية الراقية، وعلى الرغم من أن ريكير وهدلبرانت كتبا مقالتهما قبل مجيء التكنولوجيا الحيوية بالصورة التى نعرفها اليوم، وحتى قبل أن تداول مصطلح التكنولوجيا الحيوية، إلا أن تنبؤهما كان يتضمن ما يؤيد أقوالهما.

ويعد مجال التكنولوجيا الحيوية النباتية من المجالات المزدهرة حالياً، والعديد من طرق زراعة الخلايا والأنسجة النباتية قد أنتجت أو يحتل أن تنتج فى المستقبل القريب منتجات أو نباتات مفيدة، ويجرى استخدام الطرق فى استيلاء أنواع نباتية جديدة وفى إنتاج المركبات المهمة التى يصعب الحصول عليها من التخليق الكيميائى، وتنسأوى أهمية القدرة على استزراع الخلايا النباتية مع استخدام أساليب الهندسة الوراثية لإدخال جينات جديدة إلى الأنواع النباتية.

استخدام مزرعة الخلية فى إكثار النبات The use of cell culture for plant propagation

استحدثت زراعة الأنسجة أساساً من أجل تسهيل عملية التكاثر الاستساخى للأصناف البستانية horticultural species، وفى طريقة التكاثر الاستساخى تتكاثر النباتات بطريقة لاجنسية asexually، بحيث تتطابق جميع الأفراد الجديدة مع النبات الأصلى، أى أن جميع الأفراد تكون أعضاء من مستنسخ واحد clone، واكتسب بستانيو الحدائق خبرة طيبة من التجارب الشائعة للتكاثر الاستساخى، مثل تكاثر البنفسج الأفريقى الجديد new African violet أو نباتات الفلوندرون philodendron من عقل الشتلات ، وتفلح هذه الطريقة مع نباتات الزينة، لأن العديد من النباتات، خصوصاً المهجنة منها، إما لا يمكن تربيتها بطريقة جنسية أو أنها إذا تكاثرت جنسياً فإنها تفقد بعض الصفات المرغوبة التى تربت فيها.

وعلى سبيل المثال، تحتوى مجموعة أشجار زيت النخيل عادة شجرة أو اثنتان متوفقتان على الأخريات، وتسمى بشجرة نخبة elite tree، فإذا تكاثرت الأشجار النخبة بطريقة جنسية، فسوف تفقد صفاتها الفائقة، واستطاع لورى جونز Laurie Jones من مؤسسة يونليفير فى بدفورد بإنجلترا فى الآونة الأخيرة إكثار أشجار زيت النخيل النخبة باستخدام طرق زراعة الأنسجة، ونتيجة لذلك فتح الطريق أمام إكثار الأشجار دون أن تفقد صفاتها الفائقة.

وإنتاج "البذور التخليقية" synthetic seeds ، يعد وسيلة أخرى من وسائل إكثار النباتات التى لا تخضع للإكثار الجيسى، حيث يمكن إكثار الخلايا

الجسدية somatic cells لبعض النباتات فى المزرعة، وبعد ذلك تستحث على تكوين الأجنة، (والخلايا الجسدية لكائن عضوى، هى جميع الخلايا، عدا الخلايا الجرثومية)، وتنتج البنور التخليقية عن طريق تغليف الأجنة بغطاء وقائى، يجعلها تعامل تقريباً كالبنور التقليدية.

ولما كانت الأجنة النباتية تنمو فى مستعلق مزرعى suspension culture، فإن الطريقة تناسب إنتاج بذور تخليقية بمقادير كبيرة، ويمكن أن يتم الاستزراع فوراً فى مفاعلات حيوية ذات مرشح دوار spin-filter bioreactors، تسمح بفصل الأجنة من سوائل المزرعة بطريقة سهلة، وهناك مزايا عديدة لهذه الطريقة تشمل التحكم البيئى والقدرة على إنتاج كميات كبيرة غير محدودة من الأجنة، ومع ذلك فهناك بعض العيوب التى يجب التخلص منها، وتشمل هذه العيوب على التكاليف العالية للوسط المزرعى وعدد الأنواع المحدود الذى سيكون أجنة فى المزرعة.

ويرى علماء الأمراض النباتية plant pathologists أيضاً أن طرق زراعة الخلايا والأنسجة النباتية من الطرق المفيدة، فعلى سبيل المثال، يمكن أن يستخدم هؤلاء الباحثون هذه الطرق لإنتاج المجموعات المنتظمة من الخلايا التى يحتاجون إليها فى دراسة تأثيرات مسببات المرضية للنبات، ويمكن من بين أشياء أخرى، حث بعض صور الخلايا المستزرعة على الانقسام بطريقة متزامنة، ذلك الموقف الذى يسهل دراسة البيولوجيا الجزيئية للعدوى الفيروسية وتكرارها.

ويأتى التطبيق الآخر لطرق زراعة الخلية فى إنتاج سلالات نباتية خالية من الأمراض، حيث يمكن أن تعقم الخلايا النباتية المستزرعة للتخلص من البكتيريا

ومسببات الأمراض الأخرى التى تحدث أحياناً عدوى مستديمة للنباتات كلها، وقد أمكن الحصول بهذه الطريقة على سلالات خالية من مسببات الأمراض من أعشاب علف الماشية والبقوليات ، بالإضافة إلى ذلك، تعتبر طريقة الحفظ بالتبريد cryopreservation، التى تجمد من خلالها الخلايا النباتية المستزرعة من أجل التخزين، وسيلة لحفظ أنواع نباتية غير عادية لفترات طويلة.

نشوء التباين فى مزارع الأنسجة

The generation of somaclonal variation in plants

على الرغم من أنه يجرى استخدام أساليب زراعة الخلية فى إكثار النباتات بطريقة استنساخية، ومن ثم الحفاظ على صفات مرغوبة فى الذرية، إلا أنه غالباً ما تحدث نظم الاستزراع تغييرات وراثية فى النباتات الناتجة من الخلايا المستزرعة، ويوجد حالياً اهتمام كبير بهذا التغير، الذى ربما يقدم طريقة لإنتاج صفات مرغوبة جديدة فى أنواع متوطنة من الأنواع المحصولية، كالاهتمام الموجود فى الإبقاء على الثبات خلال التكاثر الاستنساخى.

والتغير الذى يحدث فى النباتات التى تجددت عن طريق أنسجة أو خلايا مستزرعة، يأتى كشيء مفاجيء، فكل الخلايا الجسدية من نبات واحد، يجب أن يكون لها نفس التركيب الوراثى، وكان يتوقع من النباتات المتجددة من هذه الخلايا أن تكون متماثلة ، وبدلاً من ذلك، فإنها غالباً ما تبدى قدر كبير من التنوع فى صفاتها، هذا التغير الاستنساخى الجسدى كما يطلق عليه، لم يعرف أنه تغير كلى الوجود إلا مؤخراً فى عام ١٩٨١، وعلى الرغم من أن أسباب التغير

الاستساخى الجسدى لم يتم معرفته بدقة ،إلا أنه من المحتمل أنه ينشأ كنتيجة لتغير وضع الـ د.ن.أ

وقد كان يعتقد منذ أربعين عامًا مضت أن المادة الوراثية فى غاية الثبات عندما اكتشفت باربرا ماكلنتوك Barbara McClintock من معمل كولد سبرنج هاربر فى لونغ أيلاند بنيورك العناصر الانتقالية "transposable elements" فى نبات الذرة ، تلك العناصر التى قد توجد فى كل الأنواع،هى عبارة عن قطع من د.ن.أ تنتقل من مكان لآخر فى مجموعة العوامل الوراثية،وتسبب أحياناً طفرات عندما تدخل فى الجينات وتمزقها، ويمكن أن تنعكس الطفرات أيضاً إذا ما غادرت العناصر الجينات الممزقة، وعلى ما يبدو فإن الظروف المستخدمة فى زراعة الأنسجة النباتية تحفز على تحرك العناصر الانتقالية،وتؤدى بالتالى إلى تغير استساخى جسدى بصورة متكررة فى نباتات تتكاثر من الخلايا المستزرعة.

ويوضح التغير الاستساخى الجسدى الحادث فى نباتات الخس والطماطم كيف يمكن استخدام زراعة الخلايا والانسجة لهذا الغرض، وقامت كريستين برون Christine Browne وجون لوكاس John Lucas وبرايين باور Brian Power بإجراء تجارب على الخس فى جامعة نوتنجهام فى انجلترا،ومن أجل هذا البحث،قام الباحثون فى البداية بإنتاج كالوس من كل من أنواع الخس الثلاثة،عن طريق استزراع الفلقات (وهى الأوراق الأولى الناتجة من إنبات البذرة)، أو الأوراق البالغة النضج، وبعد ذلك جدد برون ولوكاس وباور النباتات كلها من

نسيج الكالوس بواسطة إجراء سريع فى خطوة واحدة طوره الباحثون من أجل الخس.

وكانت الخطوة التالية،هى زراعة النباتات المجددة تحت ظروف كل من الصوبة الزجاجية glasshouse والحقل،من أجل تقييم ذرية النبات فى التغير فى عدد من الصفات،شمل على التشكل ووزن البذرة ونشاط النبتة والتفاعل مع اثنين من أمراض الخس، فطر العفونة الناعم وفيروس فسيسفاء الخس lettuce mosaic virus.

وأظهرت النباتات المتجددة لأنواع الخس الثلاثة،تغيرا استتساخيا جسديا فى هذه الصفات مع نشاط ضعيف وإغراب^٤ albinism، وتغيرات فى محتوى كلوروفيل صبغة النبات، وتغيرت النباتات أيضا فى تفاعلاتها مع فطر العفونة الناعم وفيروس فسيسفاء الخس:فالبعض كان أقل استجابة لمسببات الأمراض، وكان البعض الآخر أكثر استجابة، وأظهرت إحدى السلالات النباتية توليفة تسترعى الاهتمام من غلة متزايدة ومحتوى كلوروفيللى بالإضافة إلى أزهار مبكر.

وهذه الصفات ليست بالجديدة،ولكن السهولة التى يمكن أن تسترد بها بعد زراعة النسيج،تتناقض مع التغير قليل الحدوث الموجود فى تجارب التربية التقليدية، فتكرار التغير الذى تحدث عليه زراعة الخلية،يعتبر أكبر مما يمكن الحصول عليه من تعريض النباتات للإشعاع أو المعالجات الكيميائية التى تسبب

^٤ - إغراب: حصول حؤولة مفاجئة فى لون النبات، والإغراب غير اليرقان، وهو يحصل أيضاً فى الحيوان.

الطفرات الوراثية. وعلاوة على ذلك، فإنه يبدو أن لمرحلة التجديد تأثير تنظيفي يساعد على إلغاء التغيرات الضارة.

ومع ذلك، فالتغير على الرغم من أنه يستحث إلا أنه يمكن أن يكون ضاراً بالنبات عن أن يكون مفيداً له، لكنه من الواضح أن النباتات لا تتجدد بسهولة من خلايا مستزرعة مرت بتغيرات ضارة، كالنباتات التي تتجدد من خلايا ذات تغيرات مفيدة، وعلى أية حال، فعندما تزرع النباتات بطرق الزراعة التقليدية، فإنه يجب فحص عدد كبير منها لاكتشاف التغير الذى يكافئ لما ينشأ أثناء نظم الاستزراع.

وقد يكون لنباتات الخس التى تظهر التغير الاستساخى الجسدى إمكانية تحسين نوع المحصول،. وعلى سبيل المثال، يمكن استخدام فالسلالة التى لها ميزات مثل المقاومة المتزايدة لفطر العفونة وفيروس فسيسفاء الخس وغلة متزايدة فى برامج التربية التقليدية التى تستهدف إنتاج أنواع أفضل من الخس، ويمكن أن تثبت ميزة الإزهار المبكر أيضاً أنها ميزة مفيدة فى هذا الخصوص من خلال تقليل فترات التناسل، وتبرز هذه الأمثلة حقيقة أن إجراءات زراعة النسيج الجديد تقدم إضافة لطرق التربية التقليدية؛ وهى نادراً ما تستخدم كتكنولوجيات بديلة.

وتوضح أيضاً أبحاث الخس لمجموعة نوتجهايم، حقيقة أن الإجراءات السريعة والبسيطة تفضل دائماً، ويمكن أن يكون لها أحياناً مميزات واضحة، وقد استخدمت دراسات التغير الاستساخى الجسدى السابقة جيلات الخلايا النباتية protoplasts (شكل ١٠-٢) وهى خلايا نباتية أزيل منها جدران الخلية

الصلبة - بدلاً من نسيج الكالوس، ومع ذلك، أظهرت تجارب براون ولوكاس وباور أن تجديد نباتات الخس من الكالوس يتفوق على تجديدها من جيلات الخلايا النباتية، وتعتبر نظم جيلة الخلية النباتية مضيعة للوقت بالمقارنة بالتجديد من الكالوس بالطريقة الجديدة التي طورتها مجموعة نوتجهايم، وعلاوة على ذلك، يمكن تجديد أنواع أقل من الخس من جيلات الخلايا النباتية عن تجديدها من خلايا الكالوس.

ولما كان التكرار^٥ وأنواع التغير المرصودة في المتجددات من الكالوس تشابه مثيلتها الموجودة في المتجددات من جيلة الخلية النباتية، فيتضح أن استخدام جيلات الخلايا النباتية غير ضروري، وعلاوة على ذلك، كانت جميع نباتات الخس المتجددة من الكالوس ثنائية الصبغيات diploid؛ أى أن لها المجموعة الكاملة الطبيعية من الكروموسومات، وعلى النقيض، كانت نسبة عالية من المتجددات من جيلة الخلية النباتية رباعية الصبغيات tetraploid، لها ضعف عدد الكروموسومات التي يجب أن تكون فيها، وأظهرت خصوبة ضعيفة، وعادة ما يتضاعف عدد الكروموسومات عندما تستعد الخلايا للانقسام، وقد تصبح جيلات الخلايا النباتية رباعية الصبغيات، لأن خليتين وليدتين فشلتا في التكون بعد التضاعف، وفي غير ذلك، فإن جيلات الخلايا النباتية قد تندمج مع بعضها البعض.

والطريقة التجريبية لنشوء التغير الاستنساخي الجسدى فى الطماطم، التي تصنف من بين أعلى ثلاثين محصول عالمي (شكل ١٠-٣)، قد تضمنت إلى حد

^٥ - تكرار: (فى علم البيئة: قياس وفرة "غزارة" نوع نباتى فى جماعة نباتية محتلطة، ويميزون عموماً ست طوائف من التكرار، ويفصلون بعضها عن بعض إما بالنظر أو بوسائل أدق منه، وهذه الطوائف هى: الوافرة جداً، والوافرة، والمتردة، والطارئة، والموضعية، والنادرة.

بعيد الأوراق اليافعة الكاملة الممتدة والمأخوذة من نباتات زرعت في الصوبة الزجاجية glasshouse، وزرعت منفصلات نباتية^(١) Explants من الأوراق في وسط يعرف بأنه يسمح بتجديد هذه المنفصلات النباتية، وقد كان هناك تأثير بسيط للتغير الاستساخي الجسدى على نباتات الطماطم المتجددة من الكالوس أو من جلات الخلايا النباتية، حيث لم تستجب معظم الأنواع لأساليب تجديد جلبة الخلية النباتية.

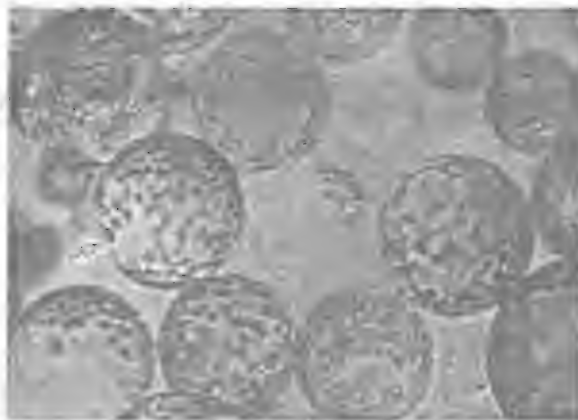
وأجرى كل من دافيد ايفانز David Evans ورودرىك شارب Roderick Sharp وزملاؤهما في مؤسسة تكنولوجيا د.ن.أ النبات (DNAP) في كينامنسون بولاية نيوجرسي، دراسة مستفيضة على المنفصلات النباتية لورق الطماطم المستزرع، وكما هو الحال عادة في النباتات المتجددة من النسيج المستزرع، أظهرت نباتات الطماطم التى تم الحصول عليها من المنفصلات النباتية الورقية تغيرات في عدد الكروموسومات.

وأظهرت نباتات الطماطم المتجددة أيضاً درجة عالية من التغير الاستساخي الجسدى، وكان الأكثر إثارة للاهتمام بشكل خاص اكتشاف طفرات الجين الواحد فى النباتات التى تجددت من الجزء النباتى المزروع من الأوراق من أنواع عديدة، وكان تكرار الطفرات التى حدثت بشكل تلقائى فى ظل ظروف المزرعة، تكراراً عالياً بنسبة ١ لكل ٢٠ من النباتات المتجددة، واشتملت الطفرات فى الجينات النووية على أنواع سائدة ونصف سائدة ومتحية. وربما

^١ - منفصل نباتى: نقل نسيج حى إلى غير بيئته لغرض علمى. (المترجم)

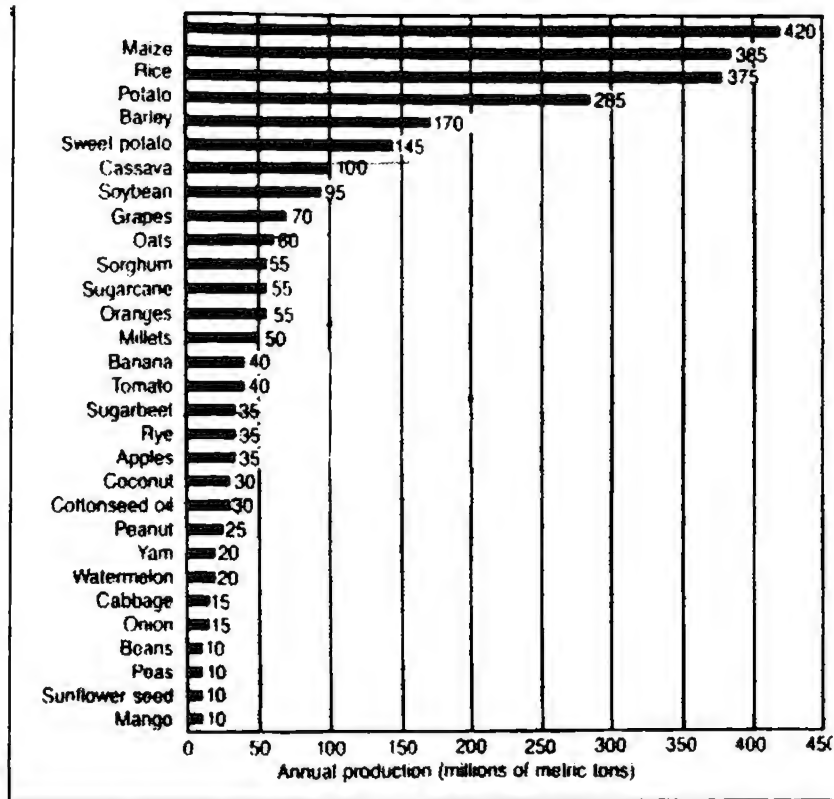
توجد الطفرات أيضاً فى الجينات الموجودة بداخل جزيئات اليخضور chloroplasts

بالإضافة إلى ذلك، فقد كانت هناك بعض الأدلة على أن طفرات الجين الواحد لنوع لم يكن موجوداً من قبل بعد تعريض النباتات للمعالجات المسببة للتحويل الخلقي التقليدية بواسطة المواد الكيميائية أو الإشعاع، يمكن استعادتها فى نباتات الطماطم المتجددة، ومن بين هذه الطفرات، الطفرات الناتجة عن طماطم ذات محتوى عال من المواد الصلبة، وهى سمة مهمة فى تصنيع الطماطم، وهذا يوضح ميزة استخدام طرق زراعة الأنسجة لإحداث تغيرات طفيفة فى نوع نباتى تكون فيه تغيرات أخرى غير مرغوبة، ويمكن اعتبار هذا التغير الاستساخى الجسدى بأنه الشكل الأكثر اعتدالاً من التلاعب الوراثى.



شكل ١٠-٢ صورة مصغرة لجزيئات خلايا تم عزلها من أوراق نوع طماطم برى، وتحضر جزيئات الخلايا بالإزالة الإنزيمية لجدران خلايا ثنيات الصلبة المحتوية على السيللوز، والحبوب الصغيرة الخضراء داخل هذه الجزيئات الخلوية هى جزيئات اليخضور، التى تحتوى على الصبغ الكلوروفيللى الأخضر، وتقوم بعملية التمثيل الضوئى. وقد يمكن إنتاج جزيئات خلوية لأنواع نباتية مختلفة من خلايا جسدية مهجنة، وهذه هى الطريقة الجديدة للحصول على الهجن من أنواع النبات التى لا يمكن تهجينها بطرق التربية التقليدية شريطة أن يمكن تجديد النبات كله من جزيئات خلايا الهجن، بالإضافة إلى ذلك يمكن إجراء الهندسة الوراثية النباتية عن طريق إدخال جزيئات فردية مستنسخة إلى جزيئات الخلايا، ويتوقف نجاح هذا التطبيق أيضاً على القدرة على تجديد النباتات كلها من جزيئات الخلايا.

٢- جزيئات اليخضور: وتسمى أيضاً حبيبات اليخضور، هى جزيئات خضراء كروية فى الأعم مصطبغة باليخضور تكون فى جيلة الخلية.



شكل ١٠-٣ مخطط يوضح أعلى ٣٠ محصول عالمي (بإستبعاد النباتات العشبية^(١))، وتظهر في المقدمة، الحبوب والقمح والأرز والبطاطس في المرتبة الثانية في القائمة ذات معدل إنتاج سنوي يصل إلى ٢٨٥ مليون طن متري، والإنتاج السنوي للطماطم الذي يصل ١٠ مليون طن متري يجعل هذا المحصول في المرتبة السابعة عشر من القائمة.

ولما كان التغير الاستتساخي الجسدي أساساً بسيطاً ويسهل الحصول عليه، فليس من المدهش أن يكون له حالياً دور مهم في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية على زراعة الخلية والأنسجة النباتية ، ومن بين الجهود البارزة بالإضافة إلى الجهود

١- نبات عشبي: يتميز بأوراق نصلية وساق عقدية ويشمل أنواع الحنطة والدخن وقصب السكر وسواها.

المبذولة لتحسين الخس والطماطم، التطبيقات الموجهة نحو تحسين المحاصيل المتكاثرة خضرياً، التي غالباً ما تتحدى طرق التكاثر التقليدية والوراثية.

وتنافس محاصيل عالمية قليلة البطاطس كهدف للتحسين بواسطة التغير الاستساخي الجسدي، وعادة ما يتكاثر هذا المحصول تكاثراً خضرياً، ومن أفضل الأنواع تلك الأنواع النشطة جنسياً. وتطور سلالات أفضل من البطاطس المنتجة للاستخدام التجاري يعد اهتماماً رئيساً في صناعة تصنيع الغذاء، وعلى سبيل المثال، يوجد بالمملكة المتحدة نوع من البطاطس يسمى Record، يزرع بموجب عقد يقتصر على إنتاج بطاطس القلي، غير أن نوع Record قليل الإنتاجية، إذ يتعرض لبعض الأمراض ويراكم سكريات مختزلة، تجعل لون البطاطس يميل للون الداكن ولا تصلح للتخزين.

ويجرى حالياً تقييم التغير الاستساخي الجسدي في النباتات المتجددة من نوع Record، وأيضاً من سلسلة أخرى من أنواع البطاطس ذات أهمية في صناعة الأغذية، وبضم هذه التقييمات إلى بعضها، فإن الدراسات التي تجرى على التغير الاستساخي الجسدي في عدة أنواع نباتية تتحدى وجهة النظر التقليدية التي تعتبر أن الطفرات الجسدية نادرة وقليلة الأهمية في ديناميكيات المجموعة النباتية.

القيود المفروضة على طرق زراعة الخلية النباتية

The limitations of plant cell culture methods

لا تعنى التطبيقات الناجحة لطرق زراعة الخلية النباتية فى إكثار النبات ونشوء التغير الاستساخى الجسدى أن جميع المشكلات قد حلت، أو أن الباحثين يستطيعون الآن عمل كل شيء بدون عمله عن طريق التكنولوجيا، وأبرز توماس أورتون Tomas Orton من DNAP سذاجة الفكرة البسيطة فى أن كائنات عضوية متعددة الخلية، مثل النباتات، يمكن جعلها تتصرف كالكائنات المجهرية، فإذا أمكن ذلك، فسوف يتمكن الباحثون من إحداث طفرات فى الخلايا النباتية، واختيار الصفات المرغوبة، وتمييز الطفرات الجديدة، كل ما فى المزرعة، والدخول فى عصر جديد لفهم تركيب ووظيفة الانتظام التطورى للجينات النباتية.

بيد أن الخلايا النباتية لا تسلك مسلك الكائنات المجهرية فى المزرعة، فالخلايا البكتيرية على سبيل المثال، تنفصل عند انقسامها مكونة وحدات متكافئة ، فى حين لا تسلك الخلايا النباتية هذا السبيل؛ فالخلايا الوليدة تظل مرتبطة وتشكل كتلة خلوية، وستكون الخلايا التى ستوجد داخل كتلة الخلية فى بيئة مختلفة تماماً عن الخلايا الموجودة خارجها، وسوف لا تتعرض لنفس ظروف الانتخاب، وعلى سبيل المثال، لن تتوفر المواد الغذائية والمكونات الأخرى فى الوسط المزرعى بدرجة كبيرة للخلايا الداخلية.

وصعوبات كهذه تناولتها أعداد كبيرة من الدراسات المعنية بانتخاب أفضل للمحاصيل النباتية من الخلايا المستزرعة، بحيث أنه يوجد حالياً تقدير جيد للقيود

المفروضة على التكنولوجيا ، وبالإضافة إلى ميل الخلايا النباتية لتكوين كتل في المزرعة، فإن هذه القيود تشمل على عدم القدرة على تجديد العديد من أنواع المحاصيل النباتية من الخلايا المستزرعة، ولا يزال موضوع تجديد النبات مجرد فن أكثر من أن يكون علماً ، وحتى إذا تجددت بعض أنواع معينة من النباتات، فقد لا تجدد الأنواع الأخرى، وقد يكون إيجاد ظروف مناسبة للتجديد مسألة مضيعة للوقت.

وبالنسبة لاختيار الطفرات المفيدة من الناحية الزراعية من مزارع الخلية النباتية، فقد قام روى شالف Roy Chaleff من E.I Dupont de Nemours وشركة في ولمنتون بدلاوار بالملاحظة وثيقة الصلة بالموضوع ،وهى إمكانية التعرف بسهولة على الصفات الوحيدة التى تعبر على المستوى الخلوى ، وعلى ذلك،وعلى الرغم من أن بعض الصفات أحادية الجين، مثل احتمال المعادن الثقيلة والأملاح ومبيدات الحشائش،قد يمكن اختيارها للمزرعة، فقد تحكم صفات مرغوبة أخرى، مثل الإنتاجية العالية وفترة الإزهار ،العديد من الجينات ولا تخضع فى الوقت الحاضر لهذه النوعية من الطرق.

وعلاوة على ذلك،فحتى إذا انتخبت خلايا ذات مقاومة متزايدة للأملاح أوالمعادن الثقيلة أو مبيدات الأعشاب،فهذا لا يعنى بالضرورة أن كل النباتات المتجددة من هذه الخلايا سيكون لها نفس المقاومة ، ففقدرة النبات على تحمل تركيزات الأملاح العالية،على سبيل المثال، ستعتمد إلى حد بعيد على قدرة جذوره على منع امتصاص الملح عن الاعتماد على مقاومة خلاياه الفريدة للملح.

ومعظم الصفات المهمة من الناحية الزراعية تعتبر حتى الآن فقيرة الفهم حتى تسمح باستنباط استراتيجيات فعالة لانتخاب النباتات المحسنة فى نظم المزرعة، ومع ذلك، فالدراسات الأساسية التى تجرى حالياً مع الخلايا والأنسجة النباتية المستزرعة، يجب أن ينشأ عنها فهم جيد لهذه الصفات، والدراسات القائمة على الطفرات المختارة من نظم زراعة الأنسجة، يحتمل أن تزيد من معرفة تطور النبات ومن الأسس الفسيولوجية والوراثية لسلسلة من الاستجابات النباتية، وسوف يساعد هذا على وضع أساس جيد للمعالجات الوراثية العديدة التى تمتد فى الوقت الحالى بالقوة الدافعة الرئيسة للتطورات الجديدة فى التكنولوجيا الحيوية للنبات.

إنتاج الهجين بإدماج جيلة الخلية النباتية

Hybrid production by protoplast fusion

بالإضافة إلى استخدام زراعة الأنسجة والخلايا النباتية فى تكوين الأجنة والأنواع الأخرى من الإكثار النباتى الاستساخى، كمصدر للتغير الاستساخى الجسدى، فإن هناك تطبيق متزايد للتكنولوجيا لإنتاج نباتات الهجين عن طريق إدماج جيلة الخلية النباتية، ويجب أن تستخدم جيلات الخلايا النباتية فى هذه التجارب لأن الخلايا التى تحتفظ بجدرانها لن تكون قادرة على الاندماج. وقد استقرت حالياً التكنولوجيا الأساسية لعزل جيلة الخلية النباتية وإدماجها، وعادة ما تزال جدران الخلية عن طريق هضمها بخليط من الإنزيمات تقوم بهدم مكونات جدار الخلية، ويمكن إحداث دمج جيلة الخلية النباتية، إما كيميائياً بواسطة مواد مثل بوليثيلين جليكول، أو باستخدام مجال كهربى.

والتحدى الباقي هو استخدام هذه التكنولوجيات بطريقة تفي بالغرض لتحسين النباتات، وتشمل قيود البحث الحالية ، الصعوبات القائمة في تجديد النباتات من جبال الخلايا النباتية المستزرعة، وفي انتخاب الهجن التى تنتج من عمليات الدمج . والتغلب أو تجنب هذه المشاكل يساوى فى أهميته التطورات الأخرى فى التكنولوجيا الحيوية.

وتقدر قيمة التحديات بشكل جيد من خلال الأخذ فى الاعتبار بعض التطبيقات المتوقعة من دمج جبلة الخلية النباتية، وعلى سبيل المثال،فغالباً ما كانت تبرز أهمية تحسين الأرز،الذى يعتبر من أهم المحاصيل الحبوبية العالمية، وقد يمكن تحقيق المقاومة المعززة للأمراض وتحمل الأملاح من خلال دمج جبال الخلية النباتية لسلالات الأرز المنزرع مع أنواع الأرز البرى، بالإضافة إلى ذلك،فقد يمكن دمج جبلة الخلية النباتية النقل المباشر لعقم الذكر السيتوبلازمى بين السلالات، هذه الصفة، التى يبدو أنها مشفرة فى مجموعة العوامل الوراثية الميتوكوندرية،تمنع النبات من إنتاج اللقاح،وبذلك تمنعه من إلقاح نفسه، ويعتبر منع التآبير الذاتىself-pollination صفة مرغوبة لدى مربى النباتات الذين يرغبون فى إنتاج هجن بواسطة التلقيح الخلطيcross-pollination مع النباتات الأخرى، وإلا فعلى المربين أن يسلكوا المهمة الشاقة فى التخلص من الأعضاء المنتجة للقاح فى النباتات التى يربونها.

غير أنه قبل إمكانية تنفيذ أى من هذه الأفكار،فهناك حاجة إلى تجديد نباتات الأرز كلها بطريقة تناسلية من جبال الخلايا النباتية، وقد بذلت جهود عديدة لتحقيق هذا الهدف،فى حين كانت النتائج فى معظمها مشكوك فيها ، ولما كانت جبال خلايا نبات الأرز التى عزلت بطريقة مباشرة من النبات لا تقوم بأى تكاثر تناسلى يعول عليه ،فقد استخدم الباحثون جبال الخلايا النباتية المعزولة من مزارع الخلية المعقعة، غير أن هذه المستحضرات قد تحتوى على خلايا

ملوثة ذات جدران سليمة، قد تكون هي نفسها قادرة على إجراء انقسام مقبول، وفي النهاية تجدد في النبات كله، وهذا يعنى أنه يمكن أن تأتي أية نباتات مجددة من خلايا سليمة، لن تكن قادرة على الانتماج وليست من جيلات الخلايا النباتية. بيد أنه في الآونة الأخيرة قام كل من جون طومبسون John Thompson ورسلان عبدالله Ruslan Abdullah والوارد كوكنج Edward Cocking من جامعة نوتنجهام بإنجلترا بتطوير نظم استزراع محسنة تمكن أيضاً من التعرف على الانقسام المقبول بواسطة جيلات خلايا نباتية فردانية، وباستخدام هذه النظم، أوضح الباحثون بما لا يدعو الشك التجديد الفعال لنباتات الأرز كلها من جيلات الخلايا النباتية بواسطة التكوين الجنيني الجسدي somatic embryogenesis (شكل ١٠-٤).

وتستلزم الأساليب التقنية أن تستحث خلايا الأرز أولاً على النمو في مزرعة معلقة لعدة شهور، وبعد ذلك، تنتج جيلات الخلايا النباتية وتنمو بنفسها في المزرعة، ولكن هذه المرة في أطباق المعمل، وتكون جيلات الخلايا النباتية المنقسمة مستعمرات تطور أجنة جسدية، ويمكن من هذه الأجنة تجديد النباتات كلها، ويحتمل تطبيق نظم مشابهة على نطاق واسع من أنواع الأرز، وفقاً لأبحاث كوكنج وزملائه.



شكل ١٠-٤ صف من نباتات الأرز التي تجذبت من جيلات الخلايا، وتنمو في صوبة زجاجية في جامعة نوتنجهام.

واستزرع باحثون آخرون جيلات خلايا اللفت (*Brassica napus*) (زيت بذرة اللفت) في نظام تنقيط مجهري يستخدم وسطاً تخليقياً، وحصل الباحثون على معدلات بقاء لجبلية الخلية النباتية تزيد على ٧٠%، وتكرار انقسام يصل إلى ٦٥%، ويجب أن يزيد البحث من معرفة فسيولوجيا أنواع الخلايا المختلفة، وإذا كان من الممكن نشرها في سلسلة من الأنواع الأخرى، فينبغي أن تحسن القدرة على استزراع منتجات محج جيلة الخلية النباتية.

ينتمى الأرز والحبوب الأخرى إلى شعبة النباتات وحيدات الفلقة^١ monocotyledonois، والتي سميت بهذا الاسم لأن لها فلقة واحدة، وثبت أن تجديد النباتات وحيدة الفلقة من جيلات الخلايا النباتية أنه أكثر صعوبة بصفة عامة من تجديد النباتات من النباتات ثنائيات الفلقة dicotyledonous، فالبقوليات على سبيل المثال، من ثنائيات الفلقة، وبالنسبة لهذه النباتات فقد حلت إلى حد كبير معظم مشاكل زراعة الخلايا والأنسجة، باستثناء تلك المشاكل المصاحبة لتجديد النباتات من جيلات خلايا فول الصويا.

والبقوليات، مثل البرسيم الأبيض (*Trifolium repens*) والبرسيم الحجازي (*Medicago sativa*)، يمكن أن تسبب حالة قاتلة بصورة محتملة، تسمى بنفخة المجترات bloat للماشية وحيوانات المزرعة الأخرى التي تأكلها، وقد يمكن الحصول على سلالات من البرسيم الأبيض والحجازي خالية من نفخة المجترات بإدماج جيلات خلايا البرسيم الأبيض مع جيلات خلايا من نبات *T. avense* وهو نوع من البرسيم، تتراكم على أوراقه عفصيات مكثفة تعمل كعوامل مضادة لنفخة المجترات، والطريقة البديلة، أن تدمج جيلات خلايا البرسيم الأبيض أو البرسيم الحجازي مع جيلات خلايا السنفون (نبات قرنفل الإزهار)، يحتوى على العفصيات فى أجزائه الخضراء، أو مع جيلات خلايا من اللوتس القرينى (نبات عشبي من الفصيلة القرنية)، الذى يعتبر علفاً بقلياً خالياً من نفخة المجترات.

^١ - وحيدات الفلقة: أحد قسمي كاسيات البزور، أما القسم الثانى فذوات الفلقتين، ومن فصائل وحيدات الفلقة النجيلية والنخلية والزنبقية والقلقاسية والسحلبية والمزمارية، الخ. (مرجع سابق ذكره). المترجم

ومع ذلك ، فإن هناك حاجة إلى الطرق التي يسهل بها فصل الهجن من أمهات جيلات الخلايا في المزرعة ، قبل أن يتحقق هذا التطبيق والتطبيقات الأخرى المحتملة لإمماج جبلة الخلية، ويمكن عزل الهجن، إذا كان يحمل كل شريك في الإمماج طفرات انتخابياً مختلفاً، وفي هذه الحالة، فلن تحتوى على كلتا الطفرتين سوى الهجن ،وبذلك يمكن تمييزها عن النباتات الأم ، وبصفة عامة لا توجد الطفرات المناسبة لهذا الانتخاب المتكامل في البقوليات والحبوب.

وعلى الرغم من أنه قد تم تجريب العزل الميكانيكي لجيلات الخلايا المدمجة، فإن الحصول على أعداد كافية لإجراء تقييم معقول ليس ممكناً عادة، ويحتمل أن يؤدي الإدخال الحديث لفرز الخلية المنشط الفلوروسنتي لفصل الهجن من جيلات الخلايا الأخرى إلى إحداث تغييرات جزئية في المعدل الذي يساعد على إجراء تقييم لإنتاج الهجين بواسطة إمماج جبلة الخلية.

وبالمثل فقد تأخر تحسين الكرنب^{١١} Brassica ، بسبب نقص طرق انتخاب الهجين، وقد حلت معظم مشاكل زراعة الخلايا والأنسجة المصاحبة لتجديد النبات من جبلة خلايا اللفت، والتحدى الباقي هو تطوير طرق انتخاب ملائمة، وأحد أهداف إمماج جبلة الخلية مع الكرنب، هو إنتاج سلالة تحتوى على عوامل عقم ذكرى سيتوبلازمية، ويجب التعرف على الأصناف المناسبة لنقل تلك العوامل.

وعلى الرغم من أن جيلات الخلايا الهجين التي تكونت من دمج طفرات مختلفة قد تم عزلها بواسطة مجموعات وراثية كاملة ، فقد تتطلب طرق

^{١١} — الكرنب (Brassica): جنس الكرنب من الفصيلة الصليبية، يشمل اللفت والقنبسط إلخ... وهى بقول مشهورة. (معجم سابق ذكره). المترجم

الإختيار هذه تطوير طفرات جديدة أو علامات مبنية على استجابات نمو تفاضلية لكل مجموعة من الأنواع، وتتضمن الطريقة البديلة أن يضم فى نوع واحد طفر زائد الاغتذاء، يفرض مطلب غذائى جديد على النبات مع طفر ستد يعطى مقاومة لمضاد حيوى.

وقد أنتج مؤخراً كوكنج وبنثال وزملاؤهما فى نوتجهم هذا الطفر المزودج للطباق (تبغ معروف أو شائع) "*Nicotiana tabacum*"، عن طريق تهجين نباتات الطباق المقاومة للإستربتوميسين مع نباتات الطباق التى بها طافر يجعلها ناقصة فى إنزيم نترات ردكتاز، ولا تستطيع النباتات التى ينقصها هذا الإنزيم أن تستمر فى النمو مع النترات (ملح حامض النتريك)، كمصدر وحيد لها من النتروجين، ولكن يجب تزويدها بالأمونيا أو بعض المصادر البديلة الأخرى من العنصر الأساسى.

وأنتج باحثو نوتجهم نباتات الطباق هذه ذات الطافر المزودج عن طريق كز من طرق التربية الجنسية القياسية، وعن طريق إدماج جيلات خلايا ملانمة. وشفرت المقاومة للإستربتوميسين فى مجموعة العوامل الوراثية لجبيلة اليخضور، حيث يقع جين نترات ردكتاز على كروموسوم داخل النواة، وتد إدماج جبلة الخلية بطريقة بحيث تنتج الهجن التى جاء السيتوبلازم المحتوى على الجبيلات اليخضورية من نبات ذى مقاومة للإستربتوميسين، وجات النوى (جمع نواة) من النبات الذى يوجد به جين نترات ردكتاز الطافر، ويمكن

"تبغ معروف أو شائع" منه صنف التبغ البلدى فى اللانقية وبعض الأصناف الأمريكية. وشك البنت وأبو ريحة والتباك البلدى فى اللانقية كلها صنف واحد تتبدل أشكاله على حسب طريقة زراعته والغاية المتوخة منه. (معجم سابق ذكره. المترجم).

تميز الهجن الناتجة، لأنها مقاومة للمضاد الحيوى الإستربتوميسين، وتتطلب مصدر نروجين غير نتراتى.

ويمكن استخدام جيلات خلايا الطباق ذات الطافر المزودج فى التهجين^{١٢} الجسدى مع جيلات خلايا سلسلة أخرى من الأصناف النباتية، ويمكن الحصول على الهجن crosses التى ستكون صعبة أو مستحيلة أو يتم الحصول عليها بواسطة طرق التربية التقليدية، وعلى سبيل المثال، عندما تستخدم جيلات خلايا البطونية^{١٣} (*Petunia hybrida*) كمشارك فى الإدماج، فيمكن أن تنتج الهجن التى يكون بها مجموعة عوامل وراثية نووية—*Petunia hybrida* ومجموعة عوامل وراثية لجبلية يخضور—*N. tabacum*، ويمكن تمييز الهجن لأنها تقاوم الإستربتوميسين وقد استعادت القدرة على النمو على النترات كنتيجة لتزويد مركب البطونية بإنزيم نترات رانكاتز.

وعند محاولة إنتاج نباتات هجين بواسطة إدماج جبلية الخلية، فمن الأفضل لو أمكن تجديد النباتات من جيلات خلايا من كلا الأبوين (الأصليين)، ومع ذلك، فقد أوضحت الدراسات الأولية على البطونية أن تجديد نبات الهجين، يعتبر ممكناً حتى لو كان أحد المشاركين فقط فى الإدماج يكون قادراً على تجديد النباتات كلها من جيلات الخلايا.

^{١٢} —التهجين: هو حصول لقاح بين نباتين من نوعين مختلفين. ونتيجة اللقاح تسمى النفل والبغل. لكن الكلمة الإنجليزية كثيراً ما تستعمل فى النبات بمعنى التهجين **crossing** وهو اللقاح نبات من نوع معلوم بنبات من النوع نفسه ولكن من صنف آخر، كإلقاح الحنطة الحورانية بالحنطة البيرودية مثلاً، وفى هذه الحال يسمى هذا العمل فى علم النبات تهجيناً، وتسمى نتيجته هجيناً. (معجم سابق ذكره). المترجم

^{١٣} — بطونية: تبغية: سميت تبغية لصلاتها النباتية بالتبغ، والاسم العلمى من البرازيلية، جنس أزهار مبذولة من الفصيلة الباذنجية تسمى بطونية، وهى تعريب الاسم العلمى. (معجم سابق). المترجم.

بالإضافة إلى ذلك، فقد اتضح في الآونة الأخيرة إن الإدماج بين جيلات خلايا الطماطم المنزرعة، التي لا تستطيع أن تجدد النبات كله، وجيلات خلايا نوع طماطم برى تكون قادرة على تجديد النبات، يمكن أن ينتج عنه إنتاج نباتات هجين جسدية ذات إخصاب ذاتي، وهذا يعني أن إنتاج الهجين عن طريق إدماج جيلة الخلية، قد يكون أقل اعتماداً على قدرة النبات على التجديد عما كان يعتقد من قبل.

إنتاج الأيض في المزرعة

Metabolite production in culture

من السمات الخاصة لبذور النباتات، تخليق منتجات أيضية ذات تنوع كبير، يشمل التربينينات terpenoids، والسترويدات steroids، والقلويدات alkaloids، والزيوت الأساسية، والصبغات pigments (جدول ١٠-١)، ويمكن استخدام مزرعة الخلية النباتية في توضيح المسارات الكيمائية المطلوبة لتخليق، وتكديس، وهدم هذه المنتجات الأيضية، وفي بعض الحالات من أجل إنتاجها الكيميائي التجاري .

وحتى وقت قريب، كان البحث الرئيس يؤكد على عزل سلاسل من الخلايا ذات قدرة على تكديس منتج يتوافق مع قدرة النبات الأصلي، وقد اعتمدت التحسينات على القدرة على استزراع الخلايا باستخدام إما زراعة كتلة الخلية أو بشل حركة الخلايا كلها.

جدول ١٠-١ منتجات طبيعية من النباتات والصناعات المصاحبة لها

الصناعة	المنتج النباتي	نوع النبات	الاستخدامات الصناعية
لدوائيات	كوديين (قلواني) ديوزجين (سترويد) كينين (قلويد) ديجوزين (جلوكوسيد ناعش للقلب) سكوبولامين (قلواني نباتي) فينكستين (قلواني)	خشخاش منوم ديزوكوريا للتويديا كينكونا لديجريانا ديجيتاليس لانات عشب استرامونيوم كاثارانثيس روزيس	مسكن عوامل مضادة للخصوبة مضاد للملاريا مقوى للقلب مضاد للتوتر الزائد مضاد لسرطان الدم
كيمولويات زراعية	بيراثرين	أقحوان	مبيد حشري
أغذية ومشروبات	كينيا (قلواني) ثيوماتين (خالقوني)	كينكونا لديجريانا ثوماتوكوكس دانيللي	عامل مسبب للمرارة محلى غير غذائي
مستحضرات تجميل	شيكونين	ليثوسبيرم إيرثروهيون	صبغة

ويمكن توضيح تطبيقات التكنولوجيا الحيوية فى طرق زراعة الخلية النباتية للأغراض التخليقية، من خلال وصف إنتاج صبغ الشيكونين الأحمر، الذى يعد المصدر النشط من الجذر الأرجوانى لنبات *Lithospermum erythorhizon*، وهو عشب دائم موطنه اليابان وكوريا والصين، ويمكن استخدام الشيكونين فى الأصباغ والمراهم ومستحضرات التجميل، وقد أنتج اللون الأحمر فى العلم اليابانى طيلة سنوات عديدة باستخدام صبغة الشيكونين.

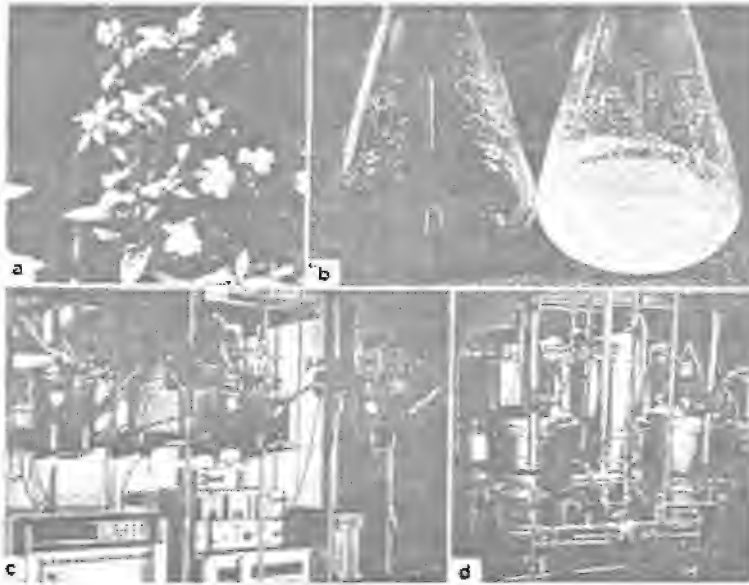
وهناك سلسلة أبحاث رائعة قام بها مامورو تاباتا Mamoru Tabata وياسوهيرو فوجيتا فى جامعة طوكيو باليابان، توصلت إلى إنتاج الشيكونين بطريقة صناعية ناجحة بواسطة طرق زراعة الخلية (شكل ١٠-٥)، وأبرز أهمية

إقران الدراسات الأساسية على إحداث الكالوس، وانتخاب الخلية والتخليق الحيوى للمنتج وتمركزه، بالدراسات التطبيقية على تحسين وسط الإنتاج.

وأوضحت الدراسات الأساسية لتبانا وفيوجيتا على الانتخاب ،أن خلايا القُلب Lithospermum (وهو جنس من الفصيلة الجَمَحِمِيَّة) المستزرعة تختلف في قدراتها التخليقية للشيكونين، وأنه يمكن زيادة محتوى صبغ الخلايا بدرجة كبيرة بانتخاب خلايا عالية الإنتاج ، ولما كانت معرفة العوامل المنظمة للأبيض على درجة من الأهمية مثل انتخاب الخلايا عالية الإنتاج، فقد اختبر الباحثون بطريقة تنظيمية تأثيرات درجة الحرارة وطول موجة الضوء وهرمونات النمو ومصادر الكربون والنيتروجين على إنتاج الشيكونين، وقد أوضحوا أنه يمكن إحداث تخليق للصبغة في مزارع الخلايا المعلقة، عن طريق إضافة مسحوق الآجار (مادة غروية تستعمل لتجميد المستنبات) لوسط المزرعة، إلا أن مادة الآجار مكلفة نسبياً، وكان من المفضل من الناحية الاقتصادية استنباط وسط إنتاج يمكن أن ينتج فيه خلايا الشيكونين في غياب الآجار.

وقد وجد تابانا وفيوجيتا أن خلايا Lithospermum ستنتج أصباغ الشيكونين بصورة دقيقة في وسط يحتوى على نترات، كمصدر نيتروجيني غير عضوى وحيد، على الرغم من أن نمو الخلية كان إلى حد ما ضعيفاً، ومن خلال التقييم النظامى لكل مكونات هذا الوسط، وجد الباحثون أن زيادة ثلاثين ضعفاً من تركيز الكالسيوم، تسبب زيادة ثلاث أضعاف في إنتاجية مشتقات الشيكونين، ولكن

بدون تحسين نمو الخلية، وقد استطاعوا في النهاية حل مشاكل نمو الخلية عن طريق استنباط نظام مزرعى ذى مرحلتين ، ففي المرحلة الأولى تنمو الخلايا في وجود الأجار، وبعد ذلك تنقل إلى وسط خال من الأجار ذى نسبة كالسيوم عالية لزيادة الحصيـلة النهائية من المنتج.



شكل ١٠-٥ في هذا الشكل المركب، (a) بين نبت الشيكونين في مرحلة ازهار، و(b) قوثر خلايا مستزرعة من النبت بحيل وبعد حثها على إنتاج صبغة الشيكونين الحمراء، (c) توضح مزارع إنتاج خلايا الصبغة في المعمل، و(d) الأوعية الكبيرة للإنتاج التجارى للصبغة.

واستنتج نباتا وفيوجيتا أن نظام زراعة الخلية لإنتاج الشيكونين يعتبر أكبر بحوالى ٨٠٠ مرة عن إنتاجه من طريقة زراعة النبات التقليدية، حيث أن محتوى الصبغة فى الخلايا المستزرعة أعلى ١٥ مرة من محتواها فى المادة النباتية. وعلاوة على ذلك، فإن طريقة زراعة الخلية تستغرق أقل من شهر حتى تكتمل بالمقارنة بـ ٤٨ شهراً لزراعة النبات بالطريقة التقليدية.

وعلى الرغم من أنه قد تم تخليق الشيكونين مؤخراً من مادة ديهيدروكسى نفتالين، فقد كان لا يزيد المنتج النهائى عن ٠,٧% ، وفى الوقت الحاضر، يعتبر إنتاج الصبغة بواسطة زراعة الخلية النباتية أكثر اقتصاداً من إنتاجه بالتخليق الكيميائى، وقد استخدم الشيكونين المنتج بكميات كبيرة فى المزرعة من خلايا نبات القلب *Lithospermum* بشكل تجارى فى إنتاج مستحضرات التجميل منذ عام ١٩٨٤.

وتقييم المدى الذى طورت فيه نوعية الطريقة بصورة ناجحة لتخليق الشيكونين، سيكون من الصعب تطبيقه على نظم أخرى، وعلى سبيل المثال، عند التحفيز على تكوين منتج من خلال تغيير ظروف الاستزراع بينما كان ناجحاً بدرجة كبيرة لإنتاج القلويد من خلال مزارعات نبات *Catharanthus roseus* (العنقاقية الوردية)، كان غير مثمر إلى حد كبير مع زراعات الخشخاش^{١٤} التى أظهرت قدرة محدودة على تكديس المورفين القلويد، ومع ذلك، فإن هذا لا يمكن إلا أن يعنى أن ظروف الاستزراع الصحيحة للإنتاج العالى من المورفين لم تكتشف بعد، ومما يجدر بالملاحظة فى هذا الخصوص، أن شدة درجة الحرارة تحدث تغييراً فى الكميات النسبية للقلويدات المختلفة الناتجة من الخلايا المستزرعة من أنواع الخشخاش العديدة.

^{١٤} — الخشخاش: جنس نباتات عشبية من الفصيلة الخشخاشية، فيه أنواع برية، وأخرى تزرع لزهرها، وفيه النوع المعروف الذى يستخرج منه الأفيون (معجم سابق ذكره). المترجم

تحويل النبات بواسطة الـ د.ن.أ. المطعم Plant transformation with recombinant DNA

توفر حالياً تكنولوجيات زراعة الخلية والأنسجة النباتية التي ناقشناها حتى الآن فرصاً للحصول على أنواع جديدة من المحاصيل النباتية المحسنة للأسواق، وعلى الرغم من ذلك، فهناك اهتمام كبير بتطبيق طرق الاستزراع التي تتضمن إدخال د.ن.أ. غريب، يتم الحصول عليه من تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم إلى خلايا النبات المستزرعة لجعلها تتحول وراثياً، على الرغم من أنه قد تمضي سنوات عديدة قبل الحصول على منتجات مهمة من الناحية التجارية بهذه الطريقة.

وقد أشار بننال وكوننج إلى أن التهجين الجسدي عن طريق إدماج جلبة الخلية والتحول الوراثي، يعتبران طريقتين مختلفتين اختلافاً جذرياً عن استغلال مجموعة العوامل الوراثية النباتية، وفي التهجين الجسدي، كما هو الحال في التهجين الجنسي، يدرك الباحث أن الشبه الظاهري^{١٥} phenotype (الصفة الملحوظة) ينتمي إلى البنية الوراثية^{١٦} genotype (تكوين وراثي معين)، غير أن الاعتماد يكون على انتخاب شبه ظاهري ثابت ومرغوب، وفي المقابل يكون الاستغلال الوراثي الناجح بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم معتمداً على العلاقة ما بين الشبه الظاهري والبنية الوراثية، لكي يتحقق من أي النشاط الكيميائي الحيوي أو التطوري يتحكم فيه أو يعدله تسلسل د.ن.أ. محدد، وسوف يعتمد نجاح هذه الطريقة على مدى إمكانية التعرف على الجينات

١٥- شبه ظاهري: صفة مماثلة بين العضوين بغض النظر عن الأصل الجيني للصفة - أي أن الكائنين المتمثلين في هذه الصفة قد لا يتماثلان بشكل متطابق في تلك الصفة.
١٦- البنية الوراثية: التكوين الوراثي للفرد أو الجنس الذي يمثلته.

المشفرة عن صفات معينة، وعزلها عن مجموعة عوامل وراثية لنبات أو نوع آخر واستنساخها، وهذه التسلسلات يمكن حينئذ نقلها إلى النباتات التى سيتم استغلالها وراثيًا، ويتركز اهتمام كبير فى الوقت الحالى على السهولة التى يمكن بها تحقيق هذا المطلب، واستخدام الخلية النباتية وزراعة الأنسجة فى هذا الخصوص.

وقد جعلت تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم من الممكن عزل كميات كبيرة من الجينات النقية التى قد يمكن استخدامها فى إنتاج محاصيل أفضل ، ومع ذلك، فقد أشار جون بنجهام من معهد تربية النبات فى كمبردج بانجلترا إلى أنه يمكن إجراء تحسين للعديد من النباتات بواسطة الطرق التقليدية الجارى استخدامها حالياً، التى لا تعتمد على الطرق المنهجية لزراعة الخلية والأنسجة ولا على أساليب الـ د.ن.أ. المطعم، وعلى الرغم من أن الأهداف تحتاج إلى تقييم بطريقة دقيقة، إلا أن الإسهامات الكبيرة يحتمل أن تأتى من الجمع ما بين أساليب الـ د.ن.أ. المطعم ونظم زراعة الخلايا والأنسجة مع طرق تربية النبات التقليدية.

وهناك فئتان من الأنظمة يستخدمان فى نقل د.ن.أ. غريب إلى مجموعة العوامل الوراثية للنباتات الراقية، يتضمن أحدهما على استخدام بكتيريا من جنس البكتير الزراعي Agrobacter كمتجهات لنقل الجينات، وجاء تطور هذا النظام من إثبات أن جزء من بلازميد Ti (وهو البلازميد المحدث للورم) من الكائن العضوى، أصبح مندمجاً فى مجموعة العوامل الوراثية لخلية النبات المصابة، وعلى ذلك يمكن للجين الغريب الذى أدخل فى موقع معين داخل بلازميد Ti، أن يدخل فى مجموعة العوامل الوراثية للنبات (انظر أيضا الفصل الحادى عشر)، بالإضافة إلى ذلك، فإنه يمكن امتصاص الـ د.ن.أ. لبلازميدات البكتير الزراعى المعزولة مباشرة بواسطة جيلات الخلايا النباتية فى المزرعة.

ومن أحد الأمور الجذابة للتحويل بواسطة البكتير الزراعى، هو أن هذا الإجراء يعتبر إجراءً مباشراً تماماً فى العديد من أنواع النبات، ويجرى تحضين أقراص الأوراق مع البكتيريا لعدة ساعات، وتتكون البراعم من خلايا الأقراص المتحولة بعد أن تنمو لعدة أسابيع قليلة فى وسط مزرعى مناسب، ويمكن الحصول على نباتات متحولة من الطباق والبتونيا فى غضون أشهر قليلة من إصابتها بالبكتيريا، وتتجح هذه الطريقة البسيطة لنقل الجينات إلى النباتات بصورة جيدة مع الأنواع التى أصيبت ببكتيريا من نوع البكتيريا الزراعية، ويمكن أن تتجدد بسهولة فى النباتات بواسطة أقراص الأوراق، وتشمل هذه الأنواع على الطماطم والطباق والعديد من البقوليات الورقية. ويحفز النجاح فى هذه الأنواع على توسيع محاولات هذا الأسلوب إلى محاصيل أخرى، مثل أنواع الكرنب والبقول الحبوبية، بيد أن النباتات الحبوبية تعتبر من وحيدات الفلقة، التى تكون أقل خضوعاً من ثنائيات الفلقة للإصابة بالبكتير الزراعى.

ولما كان احتمال تجديد البراعم يحدث أساساً من خلايا ورقة واحدة فى تلك الأنواع التى لا تكون كالوس أثناء التجديد، فإن الإجراء البسيط للإصابة بالبكتير الزراعى، قد حل بدرجة كبيرة محل طريقة نقل جيلات الخلايا من خلال استزراعها مع البكتيريا، ومع ذلك، تعتبر طريقة الاستزراع المشترك هذه جذابة جداً لنقل الجين، خصوصاً إذا توفر النظام المنتج لتجديد النبات من جيلات الخلايا. وهذه هى الحالة المنطبقة على الطباق، وعندما استزعت جيلات خلايا عمرها ١٤ يوماً من هذا النوع استزراعاً مشتركاً مع خلايا البكتير الزراعى، فقد انتقل من واحد إلى ثلاثة بالمائة منها بواسطة بلازميد Ti — د.ن.أ.

ويظهر الاختلاف بين معدل التكرارية العالية للتحويل في تجارب الاستزراع المشترك، وأيضاً في تجارب تحضين القرص الورقي مع معدل التكرارية المنخفضة للتحويل، الذي يكون عادة ٠,٠٠٠١% والذي يتم الحصول عليه عادة من تحضين بلازميدات الـ Ti المعزولة مع جيلات خلايا الطباقي أو البتونيا، وفي الآونة الأخيرة، اشتملت سلسلة الأساليب التي تحفز على امتصاص الـ د.ن.أ، على المعالجة بصدمة حرارية، وبولييثيلين جليكول، وتيار كهربى، قد زادت بدرجة كبيرة من معدل تكرارية تحويل جيلة خلية الطباقي مع د.ن.أ. غريب، إلى أن أصبحت الآن تماثل أو أفضل من المعدل الذي يتم الحصول عليه من الاستزراع المشترك مع البكتير الزراعى.

وكما يكون متوقعاً من غياب جدار خلية في جيلات الخلايا، فيبدو أنه لا يوجد حتى الآن نوع عائق لطرق الامتصاص المباشرة، فحتى حشائش وحبوب، مثل النبات العشبي *Lolium multiflorum*، والحنطة وحيدة الحبة *Triticum monococcum*، والذرة، والأرز، وقصب السكر، وهى جميعها من وحيدات الفلقة، ولا تصاب بسهولة من البكتير الزراعى، تخضع لنقل الجين المباشر إلى جيلات الخلايا.

ونتيجة لذلك، يعمل النقل المباشر للجين على تفادى القيود المفروضة على استخدام بكتيريا البكتير الزراعى كلها، والمشكلة الرئيسة الباقية التى تحد من نقل الجين إلى الحبوب، هى عدم القدرة على تجديد النباتات بكاملها من جيلات الخلايا، ومع ذلك، كما أوضحنا من قبل، فإن التجديد الممكن احدثه للنباتات من جيلات خلايا الأرز، قد أصبح الآن واضحاً بصورة مطلقة، ويبدو أنه من المحتمل، شريطة أن ينصب الاهتمام على إيجاد ظروف الاستزراع الصحيحة

بواسطة طرق مماثلة، أن تحل المشاكل الحالية بالنسبة للحبوب الأخرى والأنواع الأخرى التى تبدى مقاومة حالياً لتجديد جيلة الخلية.

ومن الواضح بوجه عام أنه يجرى تطوير طرق لتحول النباتات بواسطة د.ن.أ غريب. والتحدى القائم، هو استخدام الطرق فى نقل الصفات المهمة من الناحية الزراعية إلى النباتات، ولا يوجد سوى عدد قليل من هذه الصفات، تشمل على المقاومة لبعض مبيدات الأعشاب، تعتبر تحت سيطرة جين أو جينات قليلة تم تحديدها. ويحتمل أن يكون التقدم بطيئاً فى معظم الحالات، حيث يتحكم فى العديد من الصفات التى يرغب الزراعيون فى تحسينها جينات عديدة، وعلاوة على ذلك، فلم يتم تحديد الجينات فى معظم الحالات، بالإضافة إلى أنه لا يعرف أيضاً العوامل التى تتحكم فى تعبيرها فى مراحل معينة من تطور النبات.

وتتطبق اعتبارات مماثلة على خلايا النباتات المستزرعة لإنتاج المركبات شبه القلوية والعقاقير المهمة الأخرى، ومع ذلك، فعلى الأقل بالنسبة لهذه التطبيقات لم يعبأ الباحثون بتجديد النباتات كلها من جيلات الخلايا المنقولة.

توقعات الخلية النباتية وزراعة الأنسجة في التكنولوجيا الحيوية The outlook for plant cell and tissue culture in biotechnology

سوف تستمر طرق زراعة الأنسجة والخلايا النباتية ليكون لها التأثير القوى في التكنولوجيا الحيوية، ربما يكون أكثر على المدى الطويل من زراعة الخلية الحيوانية، بسبب القدرة على تجديد الوظائف النباتية كلها من الخلايا المستزرعة، وعلى الرغم من أن هذا الفصل قد أوضح الاستخدامات العديدة لزراعة الأنسجة والخلايا النباتية لنشوء التغير ولإنتاج الهجين بواسطة إدماج جيلة الخلية، ولإنتاج الأيضة، وللتحول بواسطة الـ د. د. ن. أ. المطعم، فإن جميع هذه التطبيقات ترتبط ببعضها ارتباطاً جوهرياً.

وعلى سبيل المثال، فقد يعزز تحول الخلايا النباتية بواسطة الجينات الغريبة إفراز منتجاً أيضاً، ويسهل بالتالي عملية استخلاص المنتج، أو، التحول بواسطة جينات من *A. rhizogenes*، التي لها علاقة بـ *A. tumefaciens*، الذي يحدث التكاثر الجنري الشاذ المعروف بمرض الشعيرة الجذرية، قد يسهل انبثاق الجنور من النباتات التي تجددت من الخلايا المستزرعة، وغالباً ما يكون انبثاق الجنور عنق الزجاجة لتجديد النبات، وعلاوة على ذلك، فقد تكون الشعيرات الجذرية هي نفسها نظاماً متحولاً، يجعل من خلاله تخليق منتج.

وأخيراً، فقد يمكن استخدام إدماج جيلات الخلايا النباتية أيضاً في إنتاج خلايا هجين، يزداد فيها تخليق منتج أيضاً، وفي التكنولوجيا الحيوية، تعتبر الطريقة التي يصنع بها المنتج هدفاً ثانوياً، وما يعول عليه هو أن تنتج بطريقة اقتصادية وبسعر منافس لأي تكنولوجيا بديلة.

الفصل الحادى عشر

تحسين المحاصيل النباتية عن طريق إدخال جينات معزولة

Improving crop plants by the introduction of isolated genes

يهدف مربى النبات إلى تحسين المحاصيل النباتية الزراعية عن طريق تغيير خصائصها الوراثية، ويتحقق هذا الهدف عادة من خلال جمع صفات وراثية لنباتات مختلفة، لكنها ترتبط فيما بينها بصلة، إما من خلال التزاوج الجيسى أو من خلال الأسلوب الأكثر تطوراً، وهو دمج الخلية الجسدية somatic cell fusion (انظر الفصل العاشر). بالإضافة إلى ذلك، يمكن إحداث طفرات وراثية فى النباتات بمعالجتها بمواد كيميائية أو بإشعاع، ولذا فسوف تكون نسبة مئوية قليلة من الطفرات الناتجة من هذه الطريقة مفيدة.

ويعد نجاح طرق تربية النبات التقليدية واضحاً، فقد كانت المساهم الرئيس فى الثورة الخضراء خلال فترة الخمسينات والستينات، والتى أدت فى النهاية إلى زيادة إنتاجية محاصيل الحبوب الرئيسة مرتين أو ثلاث مرات، وعلى الرغم من ذلك، فللطرق التقليدية بضع قيود، القيد الأول، لا يمكن إجراء تحسين وراثى معين إلا إذا كانت الصفة التى يرغب المربى فى إدخالها فى النبات المستهدف تنقل بواسطة أنواع متوافقة جنسياً، والذى يعنى أن النباتين يجب أن يكونا مرتبطين بصلة قوية.

القيد الثانى، نحتاج عمليات التهجين والهجين الرجعى backcrosses، التى يجب القيام بها لاختيار أفضل مجموعة ممكنة من الخصائص الوراثية إلى فترة

زمنية طويلة ، وكما هو معهود فإنها تصل ما بين ١٠-١٥ سنة، والسبب فى ذلك هو أن التزاوج الجنىى يضم مجموعى العوامل الوراثة من كلا الأبوين، وتكون النتيجة أن يصبح هناك عدد كبير جداً من التركيبات الوراثة ممكنأ، ولا ينجح إلا القليل من هذه التركيبات الوراثة ،ويحتاج إيجاد المجموعات المرغوبة إلى وقت كبير، وجهد، ومهارة وقدر من الفطنة والحظ. وقد أدت القدرة على عزل الجينات واستساخها،المقترنة بتطور الأساليب المعتمد عليها لإدخال جينات إلى النباتات، إلى فتح طريق جديد أمام التحسين الوراثة للنباتات،التى يمكنها التغلب على القيود الموجودة فى طرق التربية التقليدية، وتتكون استراتيجية الجديدة من البحث عن أى كائن عضوى ، سواء أكان نبات ،أو بكتيريا، أو فطر، أو حتى حيوان ، يحمل الصفة التى يرغب الباحث فى أن يدخلها إلى النبات المستهدف ،وبعد ذلك يستخدم أساليب الـ د.ن.أ.المطعم لعزل الجين الذى يتحكم فى هذه الصفة، بعد ذلك "يعاد برمجة" الجين المعزول،بحيث يمكنه أن يعبر داخل الخلايا النباتية،ويدخل محصول نباتى عن طريق متجه نقل الجين.

وبمجرد أن يتم عزل جين مفيد،فإنه يمكن نقله من حيث المبدأ إلى العديد من المحاصيل المختلفة،دون حاجة إلى برنامج تربية مطول، والقيـد الرئيس فى طرق نقل الجين، فى الوقت الراهن على الأقل ، أنها لا يمكن أن تستخدم إلا لصفات يتحكم فيها جين واحد أو عدد قليل من الجينات، هذه الصفات المفيدة،مثل صفة مقاومة مبيدات الأعشاب والأمراض تنتمى إلى هذه الفئة،وقد أوضح الباحثون بالفعل أن الصفات الجديدة للنباتات المقاومة للمبيد العشبى أو الأمراض،يمكن أن تنتج بطرق نقل الجين، وعلى الرغم من ذلك ،فلا يمكن أن

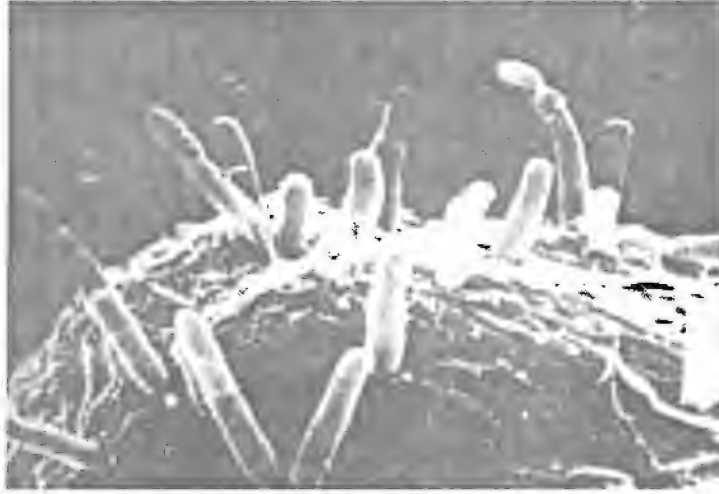
تحل أساليب نقل الجين محل برامج التربية التقليدية؛ فطرق النقل هي أداة بديلة وقوية أخرى لمربي النبات.

تطوير متجهات نقل الجين للنباتات

The development of gene transfer vectors for plants

استخدام طرق نقل خواص الجين نفسه

ظل علماء أمراض النبات مهتمين لفترة طويلة ببكتيريا التربة، بكتيريا الأورام الزراعية *Agrobacterium tumefaciens* (شكل ١١-١) بسبب الأمراض النباتية التي يحدثها ، ويمكن أن تصيب سلالات عديدة من هذا الكائن العضوى معظم أفراد إحدى شعيبتين رئيسيتين من النباتات، وهى ثنائية الفلقة *dicotyledonous* والتي سميت بذلك لأن للأجنة ورقتين بذريتين، وتعتبر معظم الأشجار والشجيرات من ثنائيات الفلقة، وكذلك أنواع محاصيل نباتية معروفة، مثل البطاطس وفول الصويا والطماطم والطباق، ويمكن أن تصيب بكتيريا الأورام الزراعية أيضاً بعض أفراد شعيبية النباتات الرئيسة الثانية، وحيدة الفلقة *monocotyledons*، والتي لها ورقة بذرية واحدة، وتشمل هذه الطائفة الحشائش ومحاصيل الحبوب الرئيسة، كالأرز والقمح والذرة.



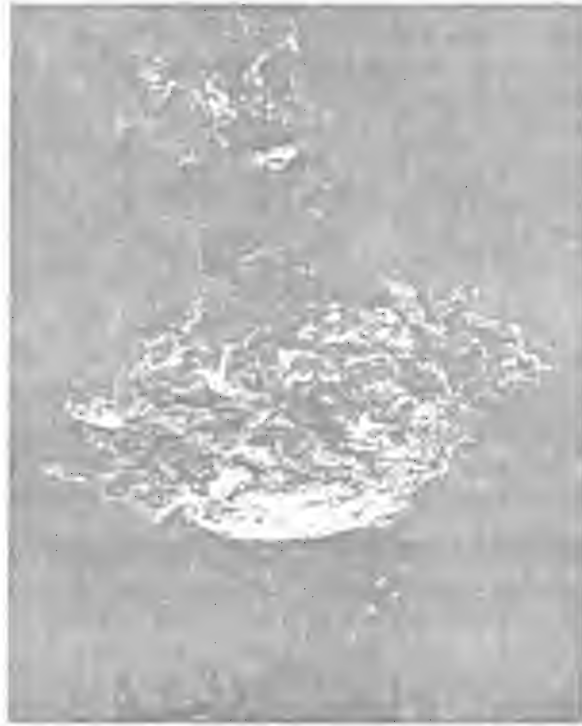
شكل ١١-١. بكتيريا الأورام الزراعية. تظهر في هذه الصورة المصغرة المسوحة إلكترونياً، بكتيريا الأورام الزراعية قضيبيّة الشكل، ومتصلة بقلنموات خلايا جنور البتلاء

وكننتيجة لإصابة بكتيريا الأورام الزراعية ثنائيات الفلقة، فإن النسيج المجروح يتكاثر مثل نمو سرطاني، يعرف باسم التدرن التاجي ^١ crown gall (شكل ١١-٢)، وهناك خاصيتان رئيستان تميزان التدرن التاجي وهما: قدرة الخلايا على النمو في مزرعة دون الحاجة إلى إضافة الهرمونات التي يتطلبها نمو خلايا النباتات الطبيعية، وتخلق خلايا التدرن التاجي مجموعة جديدة من المركبات، تسمى أوبيينات opines، والتي لا توجد في الخلايا الطبيعية، والأوبيينات، هي مشتقات الأحماض الأمينية أو السكر التي تستخدمها البكتيريا كمصادر كربون ونيتروجين، لكي تحث على تكون الورم.

^١ - تدرن تاجي: غصن إكليلي (مرض بكتيري يحدث تدرنات شاذة في أشجار الفاكهة وسواها سببه جرثومة تعرف بالاسم العلمي *Agrobacterium tumefaciens*). معجم المصطلحات الزراعية للشهابي. (المترجم).

ولقد جذبت بكتيريا الأورام الزراعية اهتمام علماء البيولوجيا الجزيئية لأول مرة، عندما اكتشفوا أن بلازميداً كبيراً، بلازميد Ti (أى البلازميد المسبب للورم)، هو المسبب للقدرات السرطانية للبكتيريا، وتكون الورم هو النتيجة المباشرة لنقل دن.أ بلازميد Ti من الخلايا البكتيرية إلى الخلايا النباتية المصابة، حيث يندمج دن.أ البلازميد داخل مجموعة العوامل الوراثية النووية، وخلية البكتيريا الزراعية هي فى الواقع عبارة عن نسخة مصغرة جداً من مهندس وراثى، يمكنها أن تحدث إدخال ثابت لجينات غريبة إلى مجموعة العوامل الوراثية لخلية النبات، ولا تسبب البكتيريا أوراماً لنباتات الحبوب، غير أن هناك دلالة غير مباشرة، بأنها يمكن أن تدخل الـ دن.أ إلى بعض أنسجة الحبوب الجينية.

وقد استغل علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية حالياً هذه القدرة وحوروا البلازميد المسبب للأورام كمتجه للقيام بالهدف بعيد التصور لإدخال جينات وظيفية جديدة إلى النباتات، غير أنه قبل أن يمكن تطوير البلازميد المسبب للأورام كمتجه ناجح ، كان على الباحثين أن يتعلموا قدراً كبيراً عن البيولوجيا الجزيئية الأساسية للبلازميد وعن تعبير الجين النباتى.



شكل ١١-٢ . ورم أهدنه بكتير الأورام الزراعية فى نبات الطباقي ، وخلال الإصابة يدخل البكتير إلى خلايا النبات د.ن.أ من البلازميد المسبب للأورام ، ويحتوى الد.ن.أ المنقول على جينات تحدث نمواً شاذاً لخلية النبات وتكون الورم ، وفى هذه الحالة ، يعطى إنتاجية عالية من هرمون النمو النباتي، ولذلك يسبب بروز أغصان خضراء من الورم.

وقد حور علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية نظام بكتيريا الأورام الزراعية لى يستخدم فى الهندسة الوراثية للنباتات المحصولية، عن طريق إزالة الجينات التى تسبب تكون الورم من البلازميد المسبب للأورام ، والجينات المشفرة عن أحد الصفات المرغوبة مثل، مقاومة الأمراض أو الأعشاب، يتم إدخالها بدلاً عن ذلك فى البلازميد لى تنتقل إلى نوع النبات المستهدف.

وتتضمن الإصابة بالبكتيريا الزراعية على الأقل مرحلتين، الأولى، يمهد تفاعل البكتيريا مع خلايا النبات لسلسلة من الأحداث تؤدي فى النهاية لأن تنتقل

إلى الخلايا النباتية قطعة معينة من البلازميد المسبب للأورام تسمى T-DNA (الـ د.ن.أ المنقول)، وفي المرحلة الثانية، يندمج الـ د.ن.أ المنقول بصورة ثابتة في مجموعة العوامل الوراثية النووية للخلايا النباتية.

وتمت المجموعات التي ساهمت في فهم البيولوجيا الجزيئية للبلازميد المسبب للأورام، واستنباط المتجهات كل من ماري دل شيلتون Mary-dell Chilton من جامعة واشنطن في سانت لويس، والتي أصبحت منذ فترة قريبة في شركة سيبا جايجي في نورث كارولينا، وروبرت فرالي Robert Fraley، وروبرت هورش Robert Horsch، وستيفن روجرز Stephen Rogers الذين يعملون بشركة مونسانتو في سانت لويس، ومورتون جوردون Milton Gordon وأيوجين نستر Eugene Nester من جامعة واشنطن في سياتل، وجوزيف شل Jozef Schell ومارك فان مونتيجو Marc Van Montagu وباتي زمبريسكي Patty Zambryski من جامعة جيهن الحكومية في بلجيكا، ومعهد ماكس بلانك لتربية النباتات في كولون بألمانيا الغربية، وروبرت شيلبروت Robert Schilperoot من جامعة ليدن في هولندا، وجاكي تيمبي Jacques Tempe من معهد الأبحاث الزراعية في فرساي بفرنسا، وآلين كير Allen Kerr من جامعة أدلايد بإستراليا.

ولكي ينقل الـ T-DNA، يجب أن تحوى البكتيريا الزراعية على جينات "خبثية" virulence، تمكن الخلايا البكتيرية من التعرف والتفاعل، ثم تدخل الـ T-DNA إلى الخلايا النباتية، وبالرغم من وقوع الجينات الخبيثة على البلازميد المسبب للأورام إلا أنها لا توجد بقطعة الـ T-DNA، والنباتات التي جرحت بطريقة ما هي الأكثر عرضة بصفة خاصة للإصابة بالبكتيريا

الزراعية، حيث تفرز النباتات المجروحة مركبات فينولية ذات أوزان جزيئية منخفضة، تعمل على تنشيط الجينات البكتيرية الخبيثة.

والشرط الثانى لإدخال د.ن.أ البكتيريا الزراعية إلى الخلايا النباتية، هو أن الـ د.ن.أ الذى سينقل، يجب أن يحاط بمجموعة من "التسلسلات المتكاملة" والتي يصل طولها إلى ٢٥ قاعدة مزدوجة، ويمكن لخلايا البكتيريا الزراعية التى تأوى الجينات الخبيثة الأساسية، نقل أية قطعة د.ن.أ، سواء أكانت بلازميداً أو موقعاً كروموسومياً، شريطة أن يكون مرتبطاً بالتسلسلات المتكاملة.

وتتعرف بعض منتجات الجينات الخبيثة على التسلسلات المتكاملة وتحدث بها قطوعات خيطية مفردة، وهذا يؤدى بدوره إلى تكون نسخ د.ن.أ خيطية مفردة من د.ن.أ فى خلايا البكتيريا الزراعية بين التسلسلات المتكاملة، وفى النهاية ينتقل الـ د.ن.أ وحيد الخيط إلى خلية النبات، ويندمج مع مجموعة العوامل الوراثية الخلوية على أنه د.ن.أ مقحم ذو خيط مزدوج، كيف يحدث هذا النقل، وما هى الآلية التى يقم بواسطتها الـ د.ن.أ ذو الخيط المفرد إلى مجموعة العوامل الوراثية لخلية النبات، لا تزال غير مفهومة.

وعلى الرغم من أن قطعة الـ T-DNA، التى تدخلها البكتيريا الزراعية عادة إلى الخلايا النباتية، تحتوى على الجينات التى يتطلبها تخليق الأوبين opine وإحداث الورم، فإن هذه الجينات ليست مطلوبة لنقل وإدخال الـ د.ن.أ. هذا الهدف الذى تستقل فيه تماماً المعلومات الوراثية للإصابة ونقل الجين عن الهدف المطلوب من أجل تكون أورام التدرن الناجى، يعتبر هدف مفيد فى تصميم متجهات لإدخال جينات جديدة إلى النباتات، ويمكن التخلص من الجينات المطلوبة لإحداث الورم، والتى قد تضر النباتات المستقبلية لها فى المتجه دون التأثير على قدرته على الانتقال بواسطة البكتيريا الزراعية، ويمكن أن يعمل أى

تسلسل د.ن.أ تحيط به تسلسلات متكاملة معينة كمتجه الذى سينتقل من خلايا البكتيريا الزراعية إلى خلايا النبات، ويمكن أن تحمل هذه المتجهات ما لا يقل عن أربعين كيلو من قواعد من د.ن.أ، تكفى للتشفير عن حوالى عشرة جينات. كانت الجينات الأولى التى حاول الباحثون استخدامها للانتقال مع المتجهات المشتقة من البلازميد المسبب للأورام جينات بكتيرية تشفر عن مقاومة المضادات الحيوية، وقد نجحت التجارب بمعنى أن متجه الـ د.ن.أ قد دخل الخلايا النباتية واندمج مع مجموعة العوامل الوراثية الخلوية، ومع ذلك، فلم تصنع المنتجات البروتينية للجينات البكتيرية فى الخلايا النباتية، ولا منتجات الجينات الغريبة الأخرى للكائنات الراقية. وعلى سبيل المثال، فإن جين الخميرة المشفر عن إنزيم alcohol dehydrogenase وجينات الحيوانات الثديية المشفرة عن بروتين بيتا-جلوبين والإنترفيرون قد فشلوا فى العمل، وقد كشف تحليل ر.ن.أ الرسول للأنسجة النباتية التى احتوت على هذه الجينات الغريبة عن أنه لم ينسخ منها شيء إلى ر.ن.أ الرسول، الذى يعتبر أولى خطوات تخليق البروتين.

وأظهرت دراسات عديدة عن تعبير الجين، أن للجينات تسلسلات منظمة، تقع عادة قبل بداية المناطق المشفرة عن البروتين، وهى لازمة لبدء عملية النسخ، وفشل الجينات البكتيرية والمختلطة والثديية فى أن تعبر فى الخلايا النباتية أوحى بأن التسلسلات المنظمة لهذه الجينات، لم تكن تتعرف عليها آلية النسخ النباتية، وعند هذه النقطة أصبح من الواضح أنه، إذا كان على الجينات الغريبة أن تعمل فى الخلايا النباتية، فسوف يحل محل تسلسلاتها المنظمة الطبيعية التسلسلات المنظمة للجينات النباتية. وأنشئت بعد ذلك الجينات الكيميرية chimaeric genes، التى ارتبطت فيها إشارات نسخ من جينات تعرف بأنها تعبر فى الخلايا النباتية

بالتسلسلات المشفرة للجينات البكتيرية المقاومة للمضاد الحيوى، وعُبرت الجينات الكميرية فى الخلايا النباتية لى تعطيها ميزة اختيارية؛ بمعنى أنه يمكن التعرف على الخلايا التى تحتوى على الجينات نظراً لقدرتها على النمو فى وجود مضاد حيوى معين، ولا تزال تحتوى عادة المتجهات المشتقة من البلازميد المسبب للأورام على جينات مقاومة للمضاد الحيوى، كعلامات اختيارية بالإضافة إلى أى جين آخر قد يرغب الباحثون فى نقله، ويستخدم نظام البكتيريا الزراعية حالياً فى إدخال جينات جديدة إلى العديد من أنواع النباتات المختلفة، التى تشمل الطباق والبتونيا والطماطم والبطاطس والبرسيم الحجازى وفول الصويا.

استخدام الفيروسات النباتية كمتجهات جينية

وكنظم تكبير جينية محتملة

Plant viruses as gene vectors and potential gene amplification systems

يعتبر استخدام الفيروسات كمتجهات لنقل الجينات إلى النباتات فى مستهل مراحلها، مقارنة بتطوير الفيروسات المستخدمة لإدخال جينات إلى الخلايا البكتيرية والثديية، وقد كان تطور الفيروسات النباتية كمتجهات تطوراً بطيئاً إلى حد بعيد، لأن الغالبية العظمى تحتوى على مجموعة عوامل وراثية من ر.ن.أ. ولا توجد سوى مجموعتين من الفيروسات النباتية -caulimoviruses و geminiviruses لها د.ن.أ. كمادة وراثية، وقد استغل أفراد من كلتا المجموعتين لإكثار وتعبير الجينات الغريبة فى الخلايا النباتية. والفيروسات من مجموعة caulimoviruses التى يعتبر فيروس فسيفساء القرنبيط (Ca MV) أحد أفرادها، هى فيروسات د.ن.أ. نباتية "ارتجاعية"، حيث تستخدم الفيروسات عادة

القدرات التخليقية للخلايا التي تصيبها لكي تتكاثر بها ، ولما كان فيروس فسيفساء القرنبيط يتضاعف كل فترة في خلايا نباتية متميزة ، يتوقف فيها تخليق الـ د.ن.أ ، فقد أنشأ الفيروس نظاماً ذا مرحلتين لنسخ الـ د.ن.أ الخاص به، المرحلة الأولى، نسخ مجموعة العوامل الوراثية فيروس فسيفساء القرنبيط ، التي تحتوى على ثمان كيلوات من قواعد الـ د.ن.أ المزدوجة الخيط في داخل مجموعة العوامل الوراثية للـ ر.ن.أ الموجودة داخل نواة الخلية العائلة، ومجموعة العوامل الوراثية للـ ر.ن.أ هذه ، تنسخ بالتالى فى وضعها الأسمى داخل د.ن.أ ذى الخيط المزدوج، عن طريق إنزيم ترانسكربتاز عكسى يشفر عن الفيروس.

ولا يعتبر فيروس فسيفساء القرنبيط نظاماً وحيداً للنسخ، لكنه أيضاً يظهر ازدواجاً نقلياً غريباً لثلاث جينات على الأقل ، تضع بعض القيود الخطيرة على استخدام الفيروس فى تعبير الجينات الغريبة فى النباتات، فلا توجد سوى جينات صغيرة لا يزيد طول قواعدها عن ٣٠٠ قاعدة مزدوجة وتخلو من الإنترونات introns ، التى تظل ثابتة ويعبر عنها فيروس فسيفساء القرنبيط، والجين الوحيد الذى يمكن أن يحل محله جين غريب، هو ذلك الجين المشفر عن عامل اكتساب أفيد aphid، وهو بروتين ضرورى لانتشار الفيروس فى الطبيعة.

والجينات التى عبر عنها بنجاح بعد إدخالها فى الخلايا النباتية بواسطة فيروس فسيفساء القرنبيط ، جين بكتيرى يسمى dihydrofolate reductase وجين الإنترفيرون البشرى، بالإضافة إلى ذلك، تحتوى مجموعة العوامل الوراثية فيروس فسيفساء القرنبيط على محرضين قويين لتعبير الجين فى الخلايا النباتية

الذين غالباً ما يوصلان بمتجهات أخرى، تشمل البلازميد المسبب للأورام، للحث على تعبير الجينات الغريبة فى النباتات.

وتتكون مجموعة العوامل الوراثية للمجموعة الثانية من فيروسات د.ن.أ النباتية، geminiviruses، من إما واحد أو اثنين من جزيئات د.ن.أ وحيدة الخيط ودائرية، ويتحول الـ د.ن.أ الفيروسي ذو الخيط الواحد الذى يصل طوله من ٢,٦ إلى ٣ كيلو من القواعد فى نواة الخلايا النباتية إلى صورة ناسخة من الخيط المزوج عن طريق آلية غير معروفة حتى الآن، وتتراكم العديد من النسخ من الصورة الناسخة لمجموعة العوامل الوراثية لفيروس geminivirus داخل نوى الخلايا المصابة، ولا توجد دلالة حتى الآن تشير إلى مرحلة نسخ عكسى فى نسخ geminivirus.

وتظهر فيروسات geminiviruses سلسلة عائل أكثر امتداداً من السلسلة التى تظهرها فيروسات caulimoviruses، وهذا يجعل من فيروسات geminiviruses أكثر ملاءمة للتطبيق العام كمتجهات لإدخال جينات جديدة فى النباتات، وعلى الرغم من أنه لا يعرف الكثير عن جينات geminiviruses ولا عن وظائفها، إلا أن هناك دلالة حديثة توحى بأن الجين المشفر عن بروتين كابسيد capsid الفيروسي، قد تحل محله جينات غريبة، دون التدخل فى نسخ مجموعة العوامل الوراثية للفيروس.

ويجرى تطوير geminivirus الحبوبى، فيروس قزامة القمح، كمتجه لإدخال جينات إلى الحبوب، وعلى الرغم من أن طول الكروموسوم الوحيد فى فيروس قزامة القمح يبلغ ٢,٧ كيلو من القواعد، إلا أنه رغم ذلك يستطيع التكيف ويدخل

جينات نسخ، يصل طولها حوالى ٣ كيلو من القواعد، وبهذه الطريقة فربما يصل طول الـ د.ن.أ الفيروسي إلى الضعف.

ونسخت جينات بكتيرية ثلاث أدخلت إلى مجموعة العوامل الوراثية لفيروس قزامة القمح بنجاح، وعبرت بعد النقل داخل خلايا مستزرعة من الحبوب، كالحنطة وحيدة الحبة *Triticum monococcum* والذرة، وهذا يفسر إمكانية استخدام *geminiviruses* كأساس للتعبير عن وحدات نسخ بصورة مستقلة فى النباتات.

الامتصاص المباشر للـ د.ن.أ بواسطة الخلايا النباتية

Direct uptake of DNA by plant cells

نقل الجين إلى جيلة الخلية النباتية

وفرت المتجهات الجينية المستمدة من البلازميد المسبب للأورام وسيلة لاختبار نشاط الجينات العلامية الكيميرية المختارة فى النباتات، فبمجرد أن يظهر جين كيميرى معين نشاطاً فى الخلايا النباتية، ويضفى ميزة اختيارية للخلايا المستقبلية، يمكن استخدامه فى التجارب التى تستهدف طرق أكثر مباشرة لإدخال الجينات المعزولة إلى النباتات.

وعلى سبيل المثال، فقد تم نقل الجينات العلامية الكيميرية إلى جيلات الخلايا نون حاجة لمساعدة المتجهات، وهى الخلايا النباتية التى أزيلت منها الجدر السلولوزية الصلبة، وهناك العديد من البروتوكولات المتوفرة حالياً لإدخال جينات جديدة إلى جيلات خلايا سلسلة متنوعة من النباتات التى تشمل على ثنائيات الفلقة، والطباق و البتونيا والجزر، والقمح وحيد الفلقة والذرة.

وفى كل هذه الحالات، فإن جيلات الخلايا قادرة على التطور داخل نوع غير متميز من النسيج يسمى الكالوس، ويمكن أن تتجدد النباتات كلها المحتوية على الدن.أ المنقول بعض أنسجة الكالوس المتكون على هذه الصورة ، وتنجح هذه الطريقة مع كالوس الطباق ومع كالوس النباتات ثنائية الفلقة، لكنها لا تنجح مع الحبوب.

وغالباً ما يدخل الدن.أ الغريب فى موقع كروموسومى واحد فى الخلايا النباتية، بالرغم من أنه من غير المحتمل أن يندمج فى مواقع متكررة، وفى معظم الحالات، فإن وراثه الدن.أ تتبع قوانين مندل للوراثه، ومع ذلك، فغالباً ما يواجه الدن.أ المندمج عدة ترتيبات مختلفة، والتى يحتمل أن تتم قبل أن يندمج مع مجموعة العوامل الوراثية النباتية، وقد يجعل هذا من النقل المباشر للدن.أ إلى داخل جيلات الخلايا، الوسيلة الأقل تفضيلاً لإدخال دن.أ غريب إلى الخلايا النباتية عن النقل بالبكتيريا الزراعية.

نقل الجينات العلامية المختارة بواسطة الحقن **Transfer of selectable marker genes by injection**

يرغب علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية فى تطبيق الطرق الجديدة لنقل الجين على التعديلات الوراثية للحبوب، التى تعتبر المحاصيل الرئيسة فى الزراعة، بيد أن البحث كان محبطاً، حيث لم يظهر أن البكتيريا الزراعية تصيب الحبوب، ولأن محاولات تجديد النباتات كلها من جيلات الخلايا الحبوبية قد باءت بالفشل - على الرغم من أن هذا الموقف قد يتغير حالياً، حيث أخبرت

مجموعات بحثية في إنجلترا وفرنسا واليابان عن تجديد جبال خلايا الأرز (انظر الفصل العاشر).

ويجرى حالياً استكشاف عدة طرق، كطرق بديلة لنقل الجينات إلى النباتات الحبوبية، وتشمل هذه الطرق استخدام فيروسات الـ د.ن.أ كمتجهات جينية، وامتصاص الـ د.ن.أ من خلال جدران الخلية اللقاح المنبت، وحقن الـ د.ن.أ في الخلايا الجرثومية قبل أن تقوم بعملية الانقسام الاختزالي^٢، وهو صورة لانقسام النواة التي ينتصف فيها عدد الكروموسومات، كمقدمة لتكوين خلايا البويضة والحيوان المنوى.

وفي الآونة الأخيرة، حصلت أليشيا دو لا بينا Alicia de la Penال من معهد ماكس بلانك على بعض النتائج الأولية الواعدة لنقل الجين إلى نبات الشيلم بطريقة حقن، وتقع الخلايا الجرثومية لنبات الشيلم في عنقود زهرى يعرف بالنورة. وتستطيع المواد المحقونة داخل النورة اختراق الخلايا الجرثومية النامية، وعلى سبيل المثال، فإن حقن مواد كيميائية، مثل البنين^٣، والكولشيسين يخترق الخلايا ويحدث بها تشوهات إنمائية.

ولكى تختبر دو لا بينا ما إذا كان الـ د.ن.أ سيخترق الخلايا أيضاً، فقد قامت بحقن النورات ببلازميدات د.ن.أ، لتكون أساساً من جين يشفر عن مقاومة

^١ - انقسام اختزالي (وهو هبوط الصبغيات إلى النصف، فتصبح النواة الشقية أى التزاوجية بسيطة الصبغيات أو أحادية الصبغيات haploid حتى إذا انمجت النواتان الشقيتان عاد عدد الصبغيات مزدوجاً فى النواة الأم فتصير ثنائية الصبغيات diploid. وهناك التى تسمى ثلاثية الصبغيات triploid، ورباعية الصبغيات tetraploid، وكثيرة الصبغيات أو متضاعفة الصبغيات polyploid).

^٢ - بنين (قلوانى أى شبه قلوئ يستخرج من ثمر البن. وهو منبه ومقو عام يحفزون به تحت الجلد).

المضاد الحيوى الكاناميسين kanamycin، والبذور التى نتجت فى النهاية تم فرزها بعد ذلك لمقاومة الكاناميسين، عن طريق إنباتها فى وجود المضاد الحيوى، وأنتجت العبوة الأولى التى استمدت من حوالى ٣٠٠ بذرة،والتي جاءت من ٧٠ نورة شيلم محقونة، ثلاث بادرات seedlings التى احتوت وعبرت عن جين مقاومة الكاناميسين، وعلى الرغم من أن هذا النجاح الأولى يجب اعتباره نجاحاً ابتدائياً، وفى حاجة إلى التكاثر،فتوضح النتيجة أنه يمكن احتمال تطوير الطرق البسيطة لإدخال جينات غريبة إلى نباتات الحبوب.

العناصر الانتقالية كمتجهات جينية محتملة

Transposable elements as gene vectors

قد يسمح الاستنساخ من الذرة والنباتات الأخرى ذات العناصر الانتقالية العديدة بأن تتطور كمتجهات لإدخال جينات جديدة إلى النباتات، وتتحرك العناصر الانتقالية بصورة طبيعية خلال مجموعات العوامل الوراثية للنباتات العائلة، إذ تدخل أولاً فى أحد الأماكن ثم تنتقل إلى مكان آخر، وقد بين العنصر الانتقالى للذرة مؤخراً بأنه قادر على تغيير وضعه فى نبات عائل جديد مثل الطباق، وهناك تجارب حالية فى مرحلة تقدم لاختبار ما إذا كانت العناصر الانتقالية المعزولة التى تحمل جينات علامة مختارة،سوف تندمج داخل مجموعة العوامل الوراثية للخلية النباتية،إذا أدخلت العوامل إلى جيلات الخلايا أو حقنت داخل النورات.

متجهات لدراسة تعبير الجين النباتى ectors for studying plant gene expression جينات نباتية تعبر بصفة دائمة

تحاط القطع المشفرة عن البروتين فى جينات الكائنات الراقية بتسلسلات تنظم تعبير الجين، وتقع عادة التسلسلات المنظمة فى جينات الخميرة والحيوانات والمطلوبة من أجل البدء الدقيق للنسخ فى الاتجاه الصاعد من البداية، أو فى التسلسلات غير المشفرة عن البروتين الموجودة فى معظم جينات الكائنات الراقية ، بالإضافة إلى ذلك، تحتوى التسلسلات فى اتجاه الهابط عند النهاية فى المناطق المشفرة على إشارات لإنهاء النسخ، ولتعديلات جزيئات ر.ن.أ رسول معينة، التى تعتبر أساسية من أجل التغير الطبيعى إلى بروتين.

وكما ذكرنا من قبل، لم تعمل الجينات البكتيرية والحيوانية فى النباتات، عندما انتقلت الجينات مع تسلسلاتها المنظمة، ومع ذلك، فقد تمكن الباحثون من إنشاء جينات وظيفية مختلطة، كانت تحاط فيها المناطق المشفرة عن الجينات غير النباتية بالتسلسلات المنظمة للجينات فى الاتجاه الهابط والصاعد، التى تعتبر نشطة فى معظم أن لم يكن كل أفراد سلسلة كبيرة من النباتات، وقد تم الحصول على هذه التسلسلات المنظمة من جينات البلازميد المسبب للأورام ، مثل التسلسلات المشفرة عن تخليق الأوبين opine، ومن جينات فيروس فسيفساء القرنبيط، وأنشئت متجهات تعبير، كانت فيها التسلسلات المنظمة فى الاتجاه الهابط والصاعد مفصولة بواسطة دن.أ رابط، الذى يمكن أن يستخدم فى إدخال المنطقة المشفرة عن أى جين مرغوب.

ويتوفر حالياً متجهات عديدة من هذا النوع، وقد تم استخدامها لنقل مجموعة مختلفة من جينات علامة مختارة داخل النباتات، تتضمن جينات عديدة مقاومة للمبيد العشبي وللمضاد الحيوى، وتعتبر الجينات التى تنقلها هذه المتجهات عادة

فى كل المراحل التطورية، و فى كل أنسجة النباتات التى تكتسبها، والحالات العرضية التى تكون فيها الجينات ساكنة، يحتمل أن تكون نتيجة للانماج فى جزء ساكن من الناحية النسخية فى مجموعة العوامل الوراثية المستقبلة، أو بسبب التعديلات الكيميائية التى تخمد نشاط الجينات الكميرية .

الجينات النباتية التى لا تعبر إلا فى ظروف معينة **Plant genes that expressed only under certain conditions**

لا يعبر العديد من الجينات النباتية بشكل دائم ، لكنها لا تنشط إلا فى أنسجة معينة أو فى مراحل تطورية، أو عندما تنشط من خلال محفز معين مثل الضوء والحرارة، وكخطوة منطقية أخرى فى إنشاء الجينات الكميرية، يبحث علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية ما إذا كانت التسلسلات الحاكمة الصاعدة لهذه الجينات المنتظمة ستعمل بطريقة طبيعية عندما ترتبط بجينات غريبة تنقل إلى النباتات. ولن تؤدى التجارب من هذه النوعية فقط إلى فهم أفضل للتحكم الجينى النباتى، بل يمكنها أن تقدم أيضاً معلومات مفيدة عن الهندسة الوراثية النهائية للنباتات، وسوف يعتمد الإدخال الناجح للعديد من الصفات الجديدة إلى النباتات دون أدنى شك على ما إذا كانت الجينات منتظمة بطريقة طبيعية فى النبات المستقبل.

وتم الحصول على بعض التسلسلات النظامية الصاعدة من جينات نشطت استجابة للضوء، ويوجد من بين هذه الجينات، جينان نوويان يشفران عن البروتينات المطلوبة للتمثيل الضوئى، حيث يوجه جين *rbcS* تخليق أصغر الوحدتان الفرعيتان من 1-ribulose و 5-bisphosphate bisphosphate ، وهو

الإنزيم الذى يحفز الخطوة الأولى فى المسار الذى يحول ثانى أكسيد الكربون إلى سكر، ويشفر جين LHCP عن البروتين الرابط a/b للكوروفيل الجامع للضوء، الذى لا ينشط إلا بعد أن ينتقل إلى جبيلة اليخضور التى يحدث بها التمثيل الضوئى.

وجينا البازلاء rbcS و LHCP، لا يصلان إلى كامل نشاطهما إلا فى أنسجة مثل الأوراق الخضراء، تحتوى على يخضورات نشطة، وتنتقل إشارة الضوء التى تسبب تنشيطهما إلى الجينين بواسطة صبغ فيتوكروم، وتنتقل الإشارة إلى جين rbcS أيضاً من خلال متقبل يستجيب للضوء الأزرق.

وقد أظهرت دراسات عديدة أن التسلسلات التى تمكن هذه الجينات الحساسة للضوء من الانتظام بطريقة دقيقة، توجد بداخل بضع مئات من قواعد د.ن.أ. المزدوجة، التى تقع تماماً فى الاتجاه الصاعد من بداية المناطق المشفرة. وعندما تتصل هذه التسلسلات المنظمة من جينات البازلاء rbcS و LHCP بالتسلسلات المشفرة عن البروتينات الغريبة، تسلك الجينات المختلطة الناتجة مسلك جينات rbcS و LHCP الطبيعية، وبمعنى آخر، إن البروتينات الغريبة لا تصنع إلا فى أوراق ينشطها الضوء ذات يخضورات كاملة النمو، وأوضح البحث أيضاً أن التسلسلات المنظمة من جين LHCP، تعمل كمخفضات لتعبير الجين فى الجذور، بالمقارنة بتأثيراتها المعتمدة على تنشيط الضوء فى الأوراق.

وجين chalcone synthase، الذى يحفز أحد الخطوات الأساسية فى تخليق الفلافونيد، يمثل نوعاً آخر من الجينات المنتظمة بالضوء، ولمركبات الفلافونيد التى تتوفر بكثرة فى النباتات العديد من الوظائف المهمة، فبالإضافة إلى

استخدامها كصبغ للزهرة، فإنها تعتبر من الآليات الدفاعية للنبات، ويمكن أن تعمل الفلافونويدات كعوامل مضادة للميكروب لحماية النبات ضد الضرر الناشئ عن زيادة الأشعة فوق البنفسجية.

وينشط جين chalcone synthase الموجود في الطباق بواسطة إشعاع من الضوء فوق البنفسجي لمدة ٢٠ ساعة، وتقع التسلسلات المنظمة المطلوبة لهذا التنشيط مرة أخرى في المنطقة الصاعدة المحيطة بالجين، ويمكن إنشاء الجينات المختلطة من خلال جمع تسلسل صاعد لجين chalcone synthase مع تسلسل مشفر غريب، وتنشط هذه الجينات المختلطة من خلال تعرضها الطويل لإشعاع الضوء فوق البنفسجي، تماماً مثل تعرض جين chalcone synthase الطبيعي.

وبعض الجينات لا تنشط بواسطة الضوء لكنها تنشط بواسطة درجات الحرارة المرتفعة، ومن بين هذه الجينات مركب من جينات "الصدمة الحرارية"، ويبدو أن تنشيطها يحمي الخلايا من الضرر الذي قد ينشأ نتيجة درجات الحرارة الأعلى من درجات الحرارة العادية، وعندما تدخل الجينات الكميرية إلى النبات والتي تحتوي على التسلسل المنظم لجين الصدمة الحرارية، فلا تنشط هذه الجينات أيضاً إلا بارتفاع درجات الحرارة .

ويقتصر تعبير العديد من الجينات النباتية على أجزاء معينة، مثل الأوراق أو البذور أو الدرنات أو العقد المثبتة للنتروجين الموجودة في جذور البقوليات، والمناطق المحيطة بالصاعدة لجينات محددة لعضو، قد تم استخدامها أيضاً في إنشاء جينات مختلطة ، وعندما تنتقل الجينات الكميرية إلى النباتات، فإنها تعبر

عادة بنفس تخصص العضو، مثل الجينات الأصلية التي تم الحصول منها على المناطق المنظمة الصاعدة .

ويمكن استخدام المناطق المنظمة المحددة للعضو في تغيير موقع تعبير الجينات النباتية، وعلى سبيل المثال، يشفر جين باتاتين patatin عن أحد بروتينات التخزين الرئيسية لدرنة البطاطس، في حين يمكن أن يتغير تخصص نسيج جين الباتاتين، بحيث يتم التعبير عنه في البطاطس أو أوراق الطباق، عن طريق إحلال تسلسله المحيط الصاعد بأحد الجينات المحددة لورق الطباق.

وتوضح هذه التجارب أيضاً أن التسلسلات المنظمة ليست محددة للأصناف، فالتسلسل من الجين الطباق المحدد للورق يعمل في البطاطس بنفس الطريقة التي يعمل بها في الطباق نفسه، وحتى جينات phaseolin، التي تشفر عن بروتينات تخزين بذور الفول تعبر بنفس تخصصها الطبيعي عن البذور، عندما تنقل إلى نباتات الطباق، وعلى ذلك يجب أن تتشابه تماماً الآلية المخلقة للبروتين وإشاراتها المتعرفة في الأنواع النباتية المختلفة.

وعلى الرغم من وقوع معظم جينات الكائنات الراقية في داخل النواة، فإن بعض الجزيئات العضوية organelles-الفئاتل الخيطية mitochondria لجميع الخلايا ويخضورات الخلايا النباتية- لها مجموعة عوامل وراثية صغيرة، وتشفر مجموعة العوامل الوراثية للفئاتل الخيطية وجبيلة اليخضور عن بعض بروتينات هذه الجزيئات العضوية، في حين تشفر الجينات النووية عن البروتينات الأخرى، ويجرى تخليق البروتينات التي تحددها الجينات النووية في السيتوبلازم، وبعد ذلك يجب نقلها إلى مستقرها الأخير في الفئاتل الخيطية أو

جبيلة اليخضور، وتحمل هذه البروتينات تسلسلات ببتيديّة محدّدة، تستخدم لتوجيهها إلى الجزيئة العضوية الصحيحة وبعد ذلك تتفصل.

ويمكن توجيه البروتينات الغريبة لكي تنتقل إلى جبيلات اليخضور عن طريق إنشاء جينات مختلطة تحمل التسلسل المشفر عن ببتيّد جبيلة اليخضور الناقل، والجين *rbcS* الذي ذكرناه من قبل، يشفر عن بروتين جبيلة اليخضور *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase*، يقع داخل النواة ويحمر تسلسلاً مشفراً مناسباً لببتيّد عبور، فعند وصل تسلسل *rbcS* الناقل بجين كاناميسين مشفر عن المقاومة للمضاد الحيوى، يجعل منتج هذا الجين المختلطة ينتقل إلى جبيلة اليخضور كما هو متوقع.

وإذا توفرت القدرة لتوجيه البروتينات التى تنتجها الجينات الغريبة إلى جزيئات عضوية محدّدة، مثل جبيلة اليخضور، يمكن أن يصبح شيئاً مفيداً جداً. فإنتاج سلالات المحاصيل النباتية ذات المقاومة المتزايدة للمبيد العشبي، تعتبر أحد أهداف الهندسة الوراثية النباتية، وبإخال جين غريب فى مجموعة العولمز الوراثية لليخضور، قد يكون من الأمور الصعبة جداً، ولكن إذا كان الجين يحمر تسلسل ناقل مناسب، فيجب أن ينقل منتجه إلى جبيلة اليخضور، بالرغم من انتهاء رحلة الجين نفسه فى النواة، وقد تعتمد محاولات تحسين التمثيل الضوئى أيضاً على القدرة على الحصول على بروتينات موجهة إلى جبيلة اليخضور.

وأوضحت أبحاث عديدة حالياً أنه يمكن استخدام المتجهات التعبيرية فى إنشاء الجينات المختلطة التى ستعبر عند نقلها إلى النباتات، وبإدماج تسلسلات تحكم مناسبة فى الجينات المختلطة، يستطيع الباحثون التأكد من استجابة الجينات

الموجودة فى النبات المستقبل عند الحاجة إلى حوافز بيئية مثل الضوء ودرجة الحرارة، وأن المنتج سوف يصنع فى أنسجة محددة.

هندسة القدرة على احتمال المبيد العشبي فى النباتات

The engineering of herbicide tolerance in plants

لقد ظهرت أهمية نظام البكتيريا الزراعية فى إنتاج سلالات نباتية ذات خصائص جديدة يمكن أن تكون مهمة للمزارعين، وفى حالة حديثة وثيقة الصلة بالموضوع، استخدم الباحثون هذا النظام فى هندسة نباتات ذات مقاومة متزايدة للجليفوسيت glyphosate، وهو المكون الفعال فى المبيد الحشري "Roundup" التى نتجها شركة مونسانتو (شكل ١١-٣).

وتستخدم المبيدات العشبية Herbicides على نطاق واسع فى الزراعة فى مكافحة الأعشاب، ومع ذلك فإن استخدام الجليفوسات محدود، ويقتصر استخدامه حالياً فى مكافحة الأعشاب المتناثرة على جوانب الطرق وفى الاستخدامات الأخرى غير الزراعية، لأن هذا المبيد، يقضى على المحاصيل النباتية بصورة فعالة مثل قضائه على الأعشاب، ويمكن تحسين قيمة الجليفوسات كعامل مضاد للأعشاب فى الزراعة، إذا أمكن هندسة المقاومة لذلك المبيد بطريقة انتقائية فى المحاصيل النباتية. فالجليفوسات يصبح فعالاً عند تركيزات منخفضة جداً، ولا يسبب سموماً للحيوانات الثديية، وسرعان ما يتحلل فى التربة بواسطة الكائنات المجهرية.



ويبيد الجليفوسيت النباتات بإعاقه الجين المشفر عن إنزيم EPSP سينساز، الذى تحتاجه النباتات لتخليق الأحماض الأمينية الأساسية، ولجعل النباتات مقاومة لجين المبيد العشبي، فإن جين EPSP سينساز يوصل أولاً بإحدى طرق الـ د.ن.أ. المطعم داخل البلازميد المسبب للأورام فى بكتيريا الأورام الزراعية، ويعاد إدخال البلازميد المطعم فى الخلايا البكتيرية، التى تصيب خلايا النباتات شديدة التأثر، مثل البتونيا أو الطباق أو الطماطم، وكنتيجة للإصابة فإن جزء البلازميد المسبب للأورام الذى يحمل جين EPSP سينساز يدخل الخلايا النباتية، و تصنع الخلايا التى تكتسب الجين الجديد كميات كبيرة من الإنزيم وبذلك يمكنها أن تنمو فى وجود تركيزات الجليفوسيت التى يمكنها أن تبيد خلايا النباتات العادية. ويمكن حينئذ أن تتجدد النباتات كلها المقاومة للجليفوسيت من الخلايا.

آليات مقاومة الجليفوسيت

Mechanisms of glyphosate resistance

يحدث الجليفوسات تأثيراته في المسار المؤدى إلى تخليق الأحماض الأمينية العطرية، الفينيلالانين phenylalanine والتيروسين tyrosine والتريبتوفان tryptophan. فإذا حرمت خلية من هذه الأحماض الأمينية، فلن يمكنها تخليق البروتينات ومن ثم تموت، والنباتات والبكتيريا والفطور لها هذا المسار، ولذلك تتعرض لتأثيرات الجليفوسات؛ ومع ذلك، لا تصنع الثدييات تصنع أحماضها الأمينية العطرية بنفسها- ويجب عليها أن تكتسبها من الغذاء التي تتناوله- وبذلك لا تتعرض لتأثيرات الجليفوسات.

وفى عام ١٩٨٠، استطاع نيكولاس أمرهين Nicholas Amrhein وزملاؤه فى جامعة رهر فى بوشم بألمانيا الغربية أن يتعرفوا على (o-enolpyruvyl-shikimate-٣-phosphate)، والذي يعرف بـ EPSP synthase، على أنه الإنزيم الذى يكبحه الجليفوسات فى البكتير Aerobacter aerogenes، وأظهرت دراسات لاحقة أن المبيد العشبي يكبح الإنزيم نفسه فى النباتات الراقية، الذى يحفز تفاعل رئيس فى المسار التخليقى للأحماض الأمينية العطرية.

وأوحى هذه النتائج بأنه يمكن جعل النبات والخلايا الأخرى تتحمل تأثير الجليفوسات، عن طريق تغيير إنزيم EPSP synthase بحيث يرتبط الإنزيم بالمبيدات العشبية بصورة أقل فعالية ونتيجة لذلك، يكون أقل عرضة للكبح، ويمكن إجراء طريقة بديلة لتحمل الجليفوسات عن طريق زيادة إنتاج EPSP synthase. وفى كلتا الحالتين، سيكون مطلوب المزيد من المبيد العشبي لى يحدث كبحاً كاملاً.

وقد تم اتباع كلا نوعى التحمل، وعلى سبيل المثال، فقد تم عزل الطفرات المقاومة للجليفوسات من بكتيريا Salmonella typhimurium و A.aerogenes، وظهر أنها تحتوى على صور من الـ P synthase، الذى يكون أقل تأثراً لكبح المبيدات العشبية.

وفى حالات أخرى، كان الإنتاج المفرط من الإنزيم سبب فى القدرة على التحمل المتزايد للجليفوسات فى الخلايا البكتيرية والنباتية، وفى الآونة الأخيرة تعرف كل من ديليب شاه Dilip Shah وروبرت فريلي Robert Fraley وزملاؤهما فى شركة مونسانتو على سلالة من خلايا هجن البتونيا تتحمل الجليفوسات، والتي نشأت من خلال زراعة الخلايا فى تركيزات متزايدة من المبيد العشبي، ويتأثر

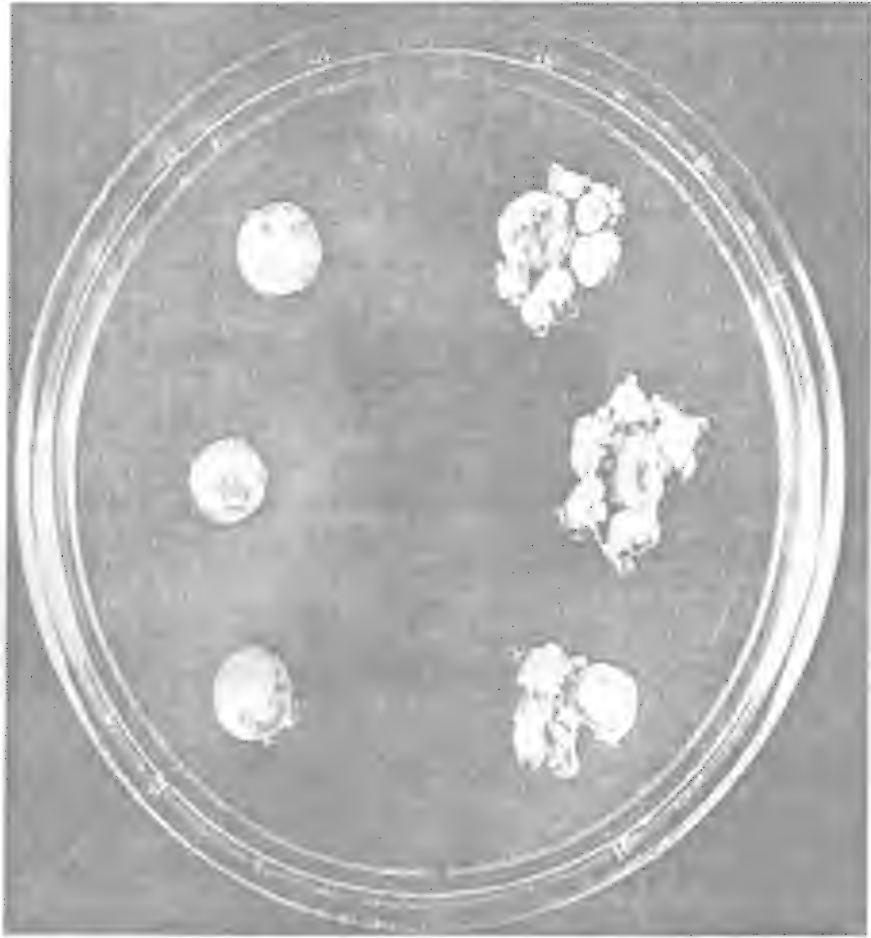
إنزيم EPSP synthase الذى تم صنعه من سلالة هذه الخلايا بالمبيد العشبي، لكنه ينتج بمقادير تصل ١٥-٢٠ مرة مما ينتج منه فى الأحوال العادية. وباستخدام مجس د.ن.أ. مستنسخ لجين EPSP، أوضح باحثو شركة مونساتو أن الجين قد تم تكبيره، وكانت النتيجة أن احتوت الخلايا على ٢٠ مرة عدد النسخ الطبيعى، وازداد أيضاً ر.ن.أ. الرسول المناظر بحوالى ٢٠ مرة، وأدى بالتالى إلى إنتاج مفرط من البروتين الإنزيمى، وقد يكون تكبير جين EPSP synthase الآلية الجزيئية الأساسية لعدد من سلالات الخلايا النباتية التى تم اختيارها لتحمل الجليفوسات. وتستخدم خلايا الكائنات الراقية عادة تكبير الجين لحصول على متطلباتها من كميات متزايدة من منتجات جينية محددة، وقد تسهم فى تحمل الخلية النباتية لمبيدات عشبية غير الجليفوسات، وتعرف مؤخراً هوارد جودمان Howard Goodman وزملاؤه فى المستشفى العام بماساشوستس فى بوسطن على سلالة خلية برسيم حجازى مقاومة للمبيد العشبي I-phosphinothricin ، وقد أوضحوا أنها تحتوى على جين مكبر يشفر عن الإنزيم المستهدف لهذا المبيد العشبي.

الحصول على نقل جين له القدرة على احتمال المبيد العشبي Achieving gene transfer of herbicide tolerance

تقترح الملاحظات التى تمت على خلايا البتونيا المتحملة للجليفوسات، أنه من الممكن الحصول على نباتات تتحمل المبيد العشبي عن طريق تغييرها وراثياً، بحيث يمكنها أن تنتج إنزيم EPSP synthase بصورة مفرطة، ولتحقيق هذا الهدف، أنشأ فى البداية باحثو شركة مونساتو، ستيفن روجرز Stephen Rogers وهارى كلى Harry Klee جيناً كميرياً، حيث وضعوا فيه تسلسل مشفر

عن البروتين لجين EPSP synthase، تحت سيطرة تسلسل منظم من فيروس فسيفساء القرنيبيط، وبعد ذلك جين EPSP synthase الكميرى فى خلايا *A. tumefaciens*، كجزء من البلازميد المسبب للأورام الذى ألغيت منه الجينات المحدثة للورم، ونقل الجين الكميرى بواسطة البكتيريا إلى خلايا البتونيا الموجودة فى أقراص ورقية، بطريقة قام بتطويرها هورش Horsch، وأنتجت الأقراص الورقية التى انتقلت باكتساب الجين الكميرى كالوس، استطاع أن ينمو فى وسط مزرعى محتوى على جليفوسات، بينما لم يستطع كالوس الأقراص الورقية الحاكمة أن ينمو (شكل ١١-٤).

ونتح تحمل نسيج الكالوس المنقول من الإنتاج المفرط لإنزيم EPSP synthase. وتجددت النباتات المحتوية على الجين الكميرى من نسيج الكالوس المنقول، ورشت بمبيد الجليفوسات بجرعة تعادل ٠,٨ رطلاً لكل فدان إنجليزى الذى يعادل تقريباً أربعة أمثال الجرعة المطلوبة للقضاء على النباتات من النوع البرى، وقاومت النباتات المنقولة رش المبيد، ونمت حتى نضجت، بينما ماتت النباتات الحاكمة (شكل ١١-٥).



شكل ٤-١١ اختبار الكالوس المتحمل للجليفوسك، أصيبت الأقراص الورقية الموضوعة على اليوسن ببكتيريا *A. tumefaciens*، الذي حمل متجها مع جين EPSP مختلط، ونقلت البكتيريا الجين إلى خلايا القرص السورقي، التي تستطيع تكوين كالوس في وسط يحتوي على الجليفوسك، وأصيبت أيضا الأقراص الورقية في بصل الصورة ببكتيريا الأورام الزراعية *A. tumefaciens*، ولكن لم تحمل البكتيريا في هذه الحالة جين EPSP، ونقلت الخلايا التبقية متفجرة بالميدي المشبي ولم تكون الكالوس في وجوده.



شكل ١١-٥ نبتات بقونيا لديها القدرة على احتمال الجليفوسات. النبتات الموجودة في أعلى الصورة، التي اكتسبت جين EPSP مختلط عن طريق نقله من بكتيريا الأورام الزراعية تحدث الرش بالجليفوسات ونمت حتى النضج في حين توقفت النبتات الحاملة (أسفل الصورة) عن النمو ومقت. (ملحوظة النبتات الحاملة، هي النبتات التي لم تعالج بنقل الجين).

يحدث التخليق الحيوي للأحماض الأمينية العطرية في جبيلة اليخضور، ويصنع إنزيم EPSP synthase في سيتوبلازم الخلية، ولذلك يجب أن ينقل إلى جبيلة اليخضور، وكشف تحليل تركيب نسخة دن.أ من ر.ن.أ رسول لإنزيم EPSP synthase، عن أنه عندما يتم تخليق الإنزيم في البداية، فإنه يحمل ببتيّد عبور يصل طوله ٧٢ حمضاً أمينياً.

وأوضح جانيش كيشور Genesh Kishore وجوى ديللا-كيوبا Guy della Cioppa من شركة مونسانتو، أن إنزيم EPSP synthase المخلّق حديثاً، الذي يحتوي

على ببتيڊ عبور، تمتصه الجيلات اليخضورية المعزولة، في حين لا تمتص البروتينات التي ليس بها ببتيڊ عبور ، واقترح الباحثون أن الإنزيم الذي ينتجه جين كميرى في نباتات البتونيا ، التي يجب أن تحتوى على ببتيڊ عبور يتمركز في الجيلات اليخضورية للخلايا النباتية.

وفي الآونة الأخيرة أيضاً قام لوكا كوماى ودافيد ستالكر وزملاؤهما فى شركة كالين فى دافيد بكاليفورنيا، بإجراء هندسة وراثية لنباتات لها تحمل متزايد للجليفوسات، ومع ذلك فقد استخدم هؤلاء الباحثون جيناً بكتيرياً يحدد شكلاً طافراً من إنزيم EPSP synthase، يكون أقل تأثراً للمبيد العشبي عن الإنزيم الطبيعى، ولم يكن بالبكتير الإنزيمى ببتيڊ العبور اللازم للانتقال إلى جيلات اليخضور، ولكن على الرغم من ذلك زاد من مقاومة النباتات المهندسة للجليفوسات، ومن المرجح أن ركيزة الإنزيم تتحرك من الجيلة اليخضورية إلى السيتوبلازم، حيث يمكن أن يؤثر عليها إنزيم EPSP synthase البكتيرى، بعد ذلك يعود المنتج إلى الجيلات اليخضورية ليتحول إلى أحماض أمينية عطرية.

وبغض النظر عن الطريقة المستخدمة، فقد أوضح الباحثون حالياً بجلاء أن نقل الجين، يمكن أن يحسن من تحمل النباتات للمبيد العشبي، على الأقل بالنسبة للمبيدات العشبية التي تكبح تفاعلات الإنزيم الواحد.

إنتاج نباتات مقاومة للفيروس بواسطة نقل الجين

The production of virus-resistant plants by gene transfer

يعد إنتاج سلالات نباتية جديدة ذات مقاومة محسنة للأمراض المعدية، هدف رئيس آخر لمربى النبات، الذي يمكن تحقيقه بواسطة طرق نقل الجين، وعلى

سبيل المثال، فقد نشأ تعاون بين الباحثين من جامعة واشنطن وشركة مونسانتو لاستخدام نظام نقل جين البكتيريا الزراعى فى إنتاج نباتات الطباق والطماطم ذات المقاومة المتزايدة لفيروس فسيفساء الطباق، ذلك الفيروس الذى يسبب مرضاً يجعل لأوراق النبات المصابة مظهر الفسيفساء.

وأثبتت النتائج صحة التوقع الذى اتجه إليه علماء البحث منذ سنوات قليلة؛ ألا وهو أنه من الممكن إنتاج نباتات تقاوم الأمراض عن طريق نقل جين أو عدة جينات إليها، وبحثوا أيضاً احتمالية أن تتجح طرق نقل الجين فى تحسين المقاومة للأمراض البكتيرية والفطرية فى النباتات.

آليات مقاومة المرض

Mechanisms of disease resistance

لا يعرف حالياً سوى النذر اليسير عن الآليات الوراثية لمقاومة المرض فى النباتات، وأحد الاحتمالات، هو أن النباتات المقاومة لكائن ممرض، تحمل جين أو عدة جينات محددة يمكنها أن تنتقل إلى النباتات المصابة، وبالتالي تحسن من مقاومة النباتات المصابة، إلا أنه لم يقم أى باحث بعزل مثل هذا الجين، لأن التفاعلات بين الطفيليات وعوائلها تفاعلات معقدة جداً.

وهناك ملاحظة أجريت فى عام ١٩٢٩، قام بها المرحوم H.H.McKinny، عندما أشار إلى طريقة أخرى ممكنة لزيادة لمقاومة النباتات للكائنات الممرضة، فقد ذكر ماكنى أنه عندما يصاب نبات بأحد السلالات الفيروسية فإنه يقاوم الإصابة بسلالة ثانية، وقد أدى هذا الاكتشاف إلى أن يعكف

علماء الأمراض النباتية على البحث عن الفيروسات التي تسبب أعراضاً معتدلة أو لا تسبب أعراضاً على الإطلاق عندما تصيب النباتات.

والنباتات التي تصاب بسلالة فيروسية معتدلة، غالباً ما تكون محمية من سلالة فيروسية أكثر خبثاً، وخصوصاً عندما يكون الفيروسان منتسبين لبعضهما البعض. وتحمل هذه الظاهرة التي تعرف بالحماية المتبادلة cross-protection على الأقل صورة ظاهرية للحماية من الأمراض الحيوانية بواسطة اللقاح ، ولما كانت الحماية المتبادلة أكثر فاعلية مع الفيروسات المنشابهة، فقد استخدمت فى تحديد درجة العلاقة بين الفيروسات. وقد استخدمت الحماية المتبادلة بطريقة ناجحة فى الزراعة، وتشمل الأمثلة الملحوظة على حماية الطماطم المزروعة فى الصوبة الزجاجية ضد فيروس فسيفساء الطماطم؛ وحماية محاصيل الحمضيات ضد فيروس الحمض tristeza؛ وحماية نباتات الباباز ضد فيروس باباز ringspot.

ومع ذلك، فإن لاستخدام أسلوب الحماية المتبادلة على نطاق واسع فى الزراعة مساوئه، أولاً، إنه يتطلب الانتشار الواسع لفيروس فى البيئة المزروعة-وهو تطبيق يرى العديد من الزراعيين أنه غير عملى، ثانياً، قد تنشأ سلالة خبيثة من سلالة فيروسية معتدلة وتحدث نقصاً كبيراً فى المحصول بدلاً من حمايته، ثالثاً، الإصابة حتى بفيروس معتدل قد يسبب نقصاً ولو أنه قليل إلا أنه ملحوظ فى إنتاجية المحاصيل، وأخيراً، تعتمد الحماية المتبادلة على عزل وتشخيص سلالة فيروسية معتدلة ملائمة، والتي غالباً ما تتطلب جهداً كبيراً. واقترح علماء الأمراض النباتية عدداً من الفروض المختلفة لتفسير الآليات الجزيئية للحماية المتبادلة. تقترح أحد هذه الفروض أن الفيروس الأول يتدخل

بطريقة ما في نسخ الـ ر.ن.أ للفيروس الثاني في خلايا الحماية المتبادلة، ولكل الفيروسات النباتية تقريباً مجموعة عوامل وراثية من ر.ن.أ، ويوقف هذا التدخل بشكل مؤثر دورات حياتها، وربما يحدث التدخل، لأن جزيئات ر.ن.أ لفيروسين يرتبطان بعلاقة وثيقة لدرجة أن ر.ن.أ الفيروس الأول يمكنه أن يهجن بكمية صغيرة من ر.ن.أ الفيروس الثاني، ويحدث إصابة مبكرة تمنع سواء نسخه أو تحوله إلى بروتين، والصورة البديلة، فقد يستغل الفيروس الأول بطريقة ما آلية نسخ الـ ر.ن.أ، وبالتالي يبطئ أو يمنع تكاثر الفيروس الثاني.

وتقترح مجموعة فروض أخرى أن الحماية المتبادلة توقف حدوث عدوى من الفيروس الثاني، وقد يحدث هذا من خلال منع الفيروس من التعرف أو الارتباط بمتقبله على سطح الخلية، ويكون من نتيجة ذلك أن يفشل في دخول الخلية، أو قد يكبح بطريقة ما، تفكيك الفيروس وإطلاق مجموعة عوامله الوراثية من ر.ن.أ داخل الخلية.

إنتاج نباتات مقاومة للفيروس

The production of virus resistance plants

على الرغم من أن الحماية المتبادلة قد فهمت بأية حال، فقد أوضح روجر بيكي Roger Beachy من جامعة واشنطن، بالاشتراك مع فرالى وروجرز أنه يمكن استخدام نقل الجين لإحداث حالة في النبات تشبه تقريباً الحماية المتبادلة الطبيعية التي تحدثها العدوى الفيروسية، واختاراً فيروس فسيفساء الطباقي (TMV) للعمل في هذه التجارب، حيث أمكن دراسة الفيروس بصورة مستفيضة، وقد مكن هذا باحثو جامعة واشنطن، باتريشيل بويللا-أبل Patricia Powell-Abel وبارون دي Baron De، من إنتاج نسخة دن.أ من مجموعة

عوامل وراثية ر.ن.أ من TMV، وللتعرف وعزل الجين الذى يشفر عن الطبقة البروتينية الفيروسية.

وقاموا بوصل جين طبقة البروتين بتسلسلات د.ن.أ أخرى، توفر الإشارات المطلوبة لبدء وإنهاء النسخ فى الخلايا النباتية، وأدخل الجين الكميرى الناتج فى بلازميد مسبب للأورام ، استؤصلت منه الجينات المحدثة للورم، بعد ذلك استخدمت شيلا ماكورميك Sheila McCormick من شركة مونسانتو بكتيريا الأورام الزراعية لنقل البلازميد المسبب للأورام مع الجين الكميرى إلى خلايا الطماطم والطباق.

وتجددت النباتات من الخلايا التى اكتسبت الـ د.ن.أ الجديد، وسمح للنباتات التى نتجت بهذه الطريقة بأن تزهر ،ونبتت البذور التى نتجت منها، ونضجت البادرات؛ التى نتجت بصورة طبيعية، ولم تظهر عليها أية صفات شاذة.وعندما حضنت بادرات طباق وطماطم صغيرة جداً مع فيروس فسيفساء الطباق ، والتى نقلها ريتشارد نلسون Richard Nelson بواسطة جين كميرى فى جامعة واشنطن، فلم تطور النباتات عدوى، أو إن أعراض المرض تطورت بصورة أبطأ مما يحدث فى النباتات الحاكمة (شكل ١١-٦). وتتكرر هذه التجارب حالياً، وقد تم تأكيدها بأكثر من ١٠٠٠ بادرة نتجت عن طريق عدة نباتات أصلية متحولة مختلفة.

كانت جميع التجارب التى أجريت حتى الآن، تتم فى ظل ظروف محكمة إما فى غرف بيئية فى المعمل أو فى الصوب الزجاجية، وأظهرت النباتات التى نمت فى ظل ظروف أكثر طبيعية فى الصوب الزجاجية درجة أعلى لمقاومة

^١ - بادرة: البادرة اصطلاح اشهر فى مصر، وهى فى اللغة رأس النبات أول ما يتقطر، ومعناه بالإنجليزية الغرس الناشئ من بذور بذرت.

فيروس فسيفساء الطبايق عن تلك النباتات التي نمت في غرف بيئية، وهي نتيجة تفترض أنه يبدو أن مقاومة النباتات في الظروف الحقلية يكون أفضل من المقاومة المشاهدة بالفعل.

لا يزال السؤال المطروح، هو ما إذا كانت المقاومة في النباتات المتحولة هي نفس المقاومة الموجودة في النباتات التي أجريت لها حماية متبادلة ضد العدوى الفيروسية، وعلى الرغم من أن عدم معرفة الإجابة، إلا أن نوعي المقاومة يظهران تشابهها، السبب الأول، كلاهما يسبب تأخر تطور المرض، وفي حالة النباتات المتحولة، يكون التأخير أساساً نتيجة لنقص حوالى ٩٠-٩٥% في عدد مواقع الإصابة على النبات، وبعض النباتات قاومت الإصابة تماماً، وإذا استشرت الإصابة، فسوف يبطئ انتشار الفيروس بسبب مقاومة النبات.



شكل ١١-٦ نباتات الطبايق المقاومة للفيروس، في صورة (a) يحمل النبات في يمين الصورة الجين للكمبرى لطبقة بروتين فيروس فسيفساء الطبايق؛ وبعد عشرة أيام من إصابة النبات بالفيروس، لا تزال أوراقه سليمة، وفي المقابل فالورق النبات في يمين الصورة، والتي لا تحتوي على جين فيروس فسيفساء الطبايق، بدأت تظهر أعراض مرض فيروس فسيفساء الطبايق، في الصورة (b) تظهر النبات بعد ١٤ يوماً من إصابتها، والنبات الموجود في يمين الصورة قد تحول بجين الطبقة البروتينية للفيروس فسيفساء الطبايق؛ بينما لم يتم تحول النبات في يمين الصورة.

والسبب الثاني، يمكن للمقاومة أن تتغلب جزئياً في كلا النباتات المتحولة وذات الحماية المتبادلة عن طريق زيادة تركيز الفيروس في مادة التلقيح

الاختبارية، بالإضافة إلى ذلك، يمكن للمقاومة أن تتغلب جزئياً أيضاً في كلا نوعى النبات إذا كانت تحتوى مادة التلقيح الاختبارية على ر.ن.أ فيروسى بدلا من الجزيئات الفيروسية الكاملة.

وأخيراً، فالمقاومة التى اكتسبتها النباتات المتحولة تنشط ضد سلالة U1 المشهورة وسلالة فيروس فسيفساء الطباق الأكثر شدة، بالإضافة إلى سلالات عديدة من فيروس فسيفساء الطماطم، وتنشط الحماية المتبادلة أيضاً ضد السلالات الفيروسية وثيقة الصلة بالفيروس المعدى الأول، وعادة ما تختفى عندما تتناقص درجة القرابة، ومع ذلك، فلما كانت الدراسات لم تشمل بعد سلالات فيروس فسيفساء الطباق أكثر بعداً من حيث القرابة، فلا يزال الوقت مبكراً جداً لمعرفة ما إذا كان سينطبق نفس الشيء على المقاومة التى يحدثها نقل جين فيروس فسيفساء الطباق، وعلى ذلك، تظهر المقاومة فى النباتات التى تحولت نتيجة ذلك رغماً عن ذلك أن لها العديد من السمات المشتركة مع المقاومة فى النباتات ذات الحماية المتبادلة ضد الأمراض الفيروسية.

استخدام مقاومة الأمراض المهندسة وراثياً فى الزراعة

Application of genetically disease resistance to agriculture

يمكن إحداث مقاومة ضد مرض فيروس فسيفساء الطباق فى نباتات الطباق والطماطم عن طريق نقل الجين، وهناك طريقة هندسة وراثية مشابهة تتم من خلالها إدخال جين مشفر عن طبقة بروتين فيروسية فى نبات، قد تكون فعالة فى حماية أنواع نباتية إضافية ضد الفيروسات الأخرى.

وهناك أمل كبير فى أن توجد طريقة مماثلة تثبت فعاليتها أيضاً ضد مسببات المرض البكتيرية والفطرية، فالحماية ضد هذه العوامل يمكن الحصول عليها عن طريق نقل جين فطرى أو بكتيرى لفىروس خبيث داخل النباتات المستهدفة، على الرغم من أن هذا أيضاً لا يزال غير واضح.

فإحداث المقاومة عن طريق نقل جين فيروسى أو فطرى أو بكتيريا داخل المحاصيل النباتية، من المفترض إلا يحدث نشاطاً أو حيوية للنباتات المستقبلة، إلا أنه لا يمكن تقييم هذا الاهتمام إلا باختبار موسع فى ظروف الصوبة الزجاجية وفى النهاية فى الظروف الحقلية.

سلالات جديدة من نباتات مقاومة للحشرات Making new strains of insect resistance

تحدث بكتيريا *Bacillus thuringiensis* بوغات بللورية لها تأثير طبيعى مبيد للحشرات ، فعندما تتغذى يرقات الحشرات على البوغات، تطلق البللورات البوغية بروتينات ذات وزن جينى عالى، وعندما تهدم الإنزيمات هذه البروتينات هداماً جزيئياً داخل القناة الهضمية، فإنها تطلق بروتينات أصغر تسمم اليرقات، ويرقات الحشرات التى تهلك من هضمها لبوغات *Bacillus thuringiensis* تشمل بذلك على يرقات البعوض والذباب، وتتأثر العديد من يرقات الفراشات التى تصيب وتدمر المحاصيل النباتية وأوراقها أيضاً بهذا البكتير.

وقد كانت مستحضرات *Bacillus thuringiensis* متوفرة لعدة سنوات، واستخدمت فى مكافحة حشرات مثل البعوض والفراشة العجرية، وكانت اليرقات الشرهة من النوع الأخير الآكلة للورق تحدث تأثيرات مدمرة على

أوراق النبات فى الجزء الشمالى الشرقى من الولايات المتحدة، وقد انتشرت الآفة بشكل سريع فى بقية البلاد بواسطة السيارات والشاحنات.

ومن مميزات استخدام *Bacillus thuringiensis* فى مكافحة الحشرات، إن تأثيرات سمومه القاتلة لا تصيب إلا الحشرات المستهدفة، وهو بذلك يعتبر مبيداً حشرياً آمناً عن المبيدات الحشرية الكيميائية التى تسمم مجموعة كبيرة من الكائنات، تضم الطيور وأنواع الحياة البرية الأخرى، والحشرات النافعة والضارة، ومع ذلك، فالمبيدات الحشرية الناتجة من *Bacillus thuringiensis* لها بعض العيوب منها، أنها مرتفعة الثمن وسرعان ما تتحلل فى ظروف الحقل.

ونتيجة لذلك، بدأ الباحثون فى استكشاف طرق جديدة لاستخدام سموم *Bacillus thuringiensis* فى مكافحة الحشرات، وتشمل إحدى هذه الطرق التى تجرى تجربتها إدخال جينات سموم مستنسخة إلى البكتيريا الأخرى، التى قد تدوم لفترة أطول فى البيئة عن *Bacillus thuringiensis* نفسه (انظر أيضاً الفصل الثامن)، وهناك طريقة أخرى تتضمن إنشاء نباتات مبيت بداخلها السموم المبيدة للحشرات، وأخيراً، استنسخ م. فيك M. Vaeck وج. ليمنانس J. LeemaNS وزملاؤهما فى النظم الوراثية النباتية فى N.V بنجت ببلجيكا، جين بلورى من *Bacillus thuringiensis* يشفر عن بروتين له وزن جزيئى ١٣٠٠٠٠، والبروتين المنقى عبارة عن سم يصيب يرقات دودة قرن الطباق *Manduca sexta* والفراشات البيضاء الكبيرة *Pieris Brassicae* مثل البلورات البوغية ذاتها. عندما يتعرض البروتين بكامله للإنزيمات الهاضمة للبروتين مثل، تريپسين أو كيموتريبسين، تنطلق كسرة صغيرة ذات وزن جزيئى ٦٠٠٠٠، تقاوم الهضم الإضافى ويبدو أنها السم النشط، والبروتين الأصغر، الذى يتكون من كل

نصف الحمض الأميني النهائي تقريباً للجزء الأكبر، يظهر النشاط السمي الكامل للبروتين الأصلي.

واستخدم باحثو جهنت في الآونة الأخيرة البلازميد المسبب للأورام في إدخال جين التوكسين المستسخ إلى نباتات الطباق، وصنع منتج الجين البكتيري في أنسجة النباتات التي اكتسبت الـ د.ن.أ. الغريب، وبدت النباتات طبيعية في كل السمات الأخرى.

واحتفظ البروتين الذي نتج في الطباق بسميته للحشرات، وماتت جميع يرقات دودة قرن الطباق التي تغذت على الأوراق المنتجة للسم في غضون أسبوع، في حين أن أقل من ٥% من اليرقات التي تغذت على أوراق النباتات الحاكمة قد ماتت أثناء نفس الفترة.

وعلاوة على ذلك، فقد حمى إنتاج البروتين السام كل النباتات ضد الأضرار التي تنجم من الحشرة، وفي اختبارات الصوبة الزجاجية، وضعت ١٥ يرقة من يرقات دودة قرن الطباق حديثة الفقس، على كل من نبات طباق بلغ طوله ٤٠ سم، وظهرت على النباتات الحاكمة أضرار كبيرة في غضون أسبوع واستهلكت بالكامل بعد أسبوعين، وفي المقابل، ماتت اليرقات التي وضعت فوق النباتات المهندسة وراثياً في غضون ٤ أيام، وكان تأثيرها الضار على النبات ضئيلاً (شكل ١١-٧). ولا يزال هناك بحث آخر مطلوب لتحديد ما إذا كانت النباتات المهندسة وراثياً لإنتاج السم البكتيري، محمية أيضاً من الضرر الذي يحدث في الظروف الحقلية.

وقد تم عزل عدد كبير من سلالات *B. thuringiensis*، التي تحدث السموم ذات النشاط المبيد الحشري ضد مجموعة كبيرة مختلفة من أنواع الحشرات، وربما يأتي يوم، يصبح من الممكن إجراء هندسة وراثية لأنواع مختلفة من المحاصيل النباتية، المدخل فيها السموم المضادة للحشرات، المحددة للآفات الحشرية التي تتغذى على تلك النباتات.



شكل ٧-١١ نبات مقاوم للحشرات مهلكنس وراثيًا، استخدم البلازميد المسبب للافات لافال جين سام من بكتيريا *B. thuringiensis* إلى نبات الطباقي الموجود في يمين الصورة، وأنتجت أوراق النبات البروتين السام، الذي قضى على يرقات أنواع حشرية معينة عندما هضمتها، ووضع ١٥ ورقة من نودة قرن الطباقي على كل نبات. ماتت اليرقات التي وضعت على النبات المهندس وراثيًا نتيجة التهامها الأوراق، ولم تحدث سوى أضرار ضئيلة للنبات، وفي المقابل، تجردت النباتات الحاكمة غير المعدلة في يسار الصورة تمامًا من الأوراق، بسبب اليرقات الطاغية للأوراق.

النتائج :

ثبت أن نظام بكتيريا الأورام الزراعية *A.tumefaciens* لإدخال جينات جديدة للخلايا النباتية هو الوسيلة الفعالة والمعتمد عليها لإجراء الهندسة الوراثية لعدد كبير من المحاصيل النباتية، وقد استخدم بالفعل في إنتاج سلالات جديدة من النباتات المقاومة للأمراض والمبيد العشبي، وربما يكون القيد الرئيس على تطبيق نظام متجه *A.tumefaciens*، هو عدد الجينات القليلة نسبياً التي يمكن أن يحملها، والصفات التي يشفر عنها بواسطة العديد من الجينات، من المحتمل أن تكون أقل استجابة للنقل بواسطة *A.tumefaciens* عن تلك الصفات التي تشفر عنها جين أو جينات قليلة.

وهناك قيد أيضاً على استخدام البكتير لنقل الجين، ويجرى أيضاً تطوير طرق أخرى لزيادة سلسلة المحاصيل النباتية التي تخضع لأساليب نقل الجين، وتشمل هذه الطرق الحقن المباشر بالـ د.ن.أ، واستخدام الفيروسات النباتية كمتجهات، ويعتبر الإيضاح الأخير، بإمكانية تجديد نباتات الأرز كلها من الجبيلات اليخضورية، تطوراً مشجعاً آخر للهندسة الوراثية لوحيدات الفلقة.

وعلى الرغم من ذلك، فإنه لا يمكن الحصول على هندسة وراثية لصفات جديدة في النباتات إلى أن يتم التعرف وعزل الجينات التي تشفر عن هذه الصفات، وقد تأخرت دراسات البيولوجيا الجزيئية للنبات عن اللحاق بدراسات البيولوجيا الجزيئية للبكتيريا والحيوانات، لكن هذا الموقف قد بدأ في التغير، ويقدم بحث نقل الجين إلى النباتات دافعا للأبحاث في البيولوجيا الجزيئية للنبات والوسائل الجديدة التي يتحقق بها هذا الهدف .

الفصل الثاني عشر

الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ وتطبيقاتها

Monoclonal antibodies and their applications

على الرغم من أن للبحث النظرى هدفا أساسيا وهو حل بعض المشاكل العلمية الأساسية، إلا أنه غالبا ما يعود بفوائد عملية مهمة. ويوضح عدد قليل من الاكتشافات هذه الفرضية أفضل مما توضحه اكتشافات تكنولوجيا الجسم المضاد أحادى الاستنساخ، التى كانت تتطرق بخطى سريعة من البحث المعملى إلى التطبيق الإكلينيكي والتجارى منذ أن أصبحت موجودة فى منتصف السبعينيات.

وتعد الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أكثر فعالية وإنتاجية إلى حد بعيد عن الأجسام المضادة المصنوعة بالأساليب التقليدية. وهذه المميزات تجعلها نموذجية فى تشخيص الأمراض المعدية، خصوصا عندما يكون التمييز بين مسببات الأمراض وثيقة الصلة ببعضها مسألة مهمة، وقد تساعد الأجسام المضادة أيضا على تشخيص السرطان، فهى تستخدم حالياً بالفعل فى مراقبة تطور المرضى الذين يعالجون من أنواع سرطانية معينة، وهناك دلالات على أن الأجسام المضادة تكتشف الانتكاسات فى وقت مبكر قبل أن تكتشفها طرق التشخيص الأخرى.

وقد وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية US Food and Drug Administration حتى الآن على ما يزيد على ١٥٠ جسما مضادا أحادى الاستنساخ لأغراض التشخيص. والعديد من هذه الأجسام المضادة لتشخيص

الأمراض المعدية، والبعض منها لمراقبة تقدم علاج السرطان. وبالإضافة إلى ذلك، تستخدم الأجسام المضادة في تحديد تركيزات الدم بدقة للعقاقير العلاجية ولبعض الهرمونات. وتعتمد اختبارات الحمل الحديثة أيضا، والتي تشمل الاختبارات المعدة للاستخدام في المنازل على الأجسام المضادة أحادية الاستساخ.

وتبدأ الأجسام المضادة أحادية الاستساخ في أن تجد لها تطبيق في علاج الأمراض بمنزل ما تستخدم في التشخيص. ولا تزال هناك محاولات جارية لاستخدامها في علاج السرطان. وينعقد الأمل على الأجسام المضادة أحادية الاستساخ، بما لها من تخصص دقيق، في أن تسلك مسلك "الطلاقات السحرية" ممتدة المفعول، التي يمكنها البحث عن الخلايا السرطانية وإبادة دون أن تلحق أضرارا كبيرة بالخلايا الطبيعية. وقد أشارت نتائج التجارب الإكلينيكية بصفة عامة إلى خلاصة مؤداها أن هذا الهدف سيصعب تحقيقه، في حين كانت النتائج رغما عن ذلك واعدة بدرجة كبيرة لتجعل من البحث يستحق أن يواصل مساعيه.

وأحد التطبيقات الإكلينيكية للأجسام المضادة أحادية الاستساخ الذي ثبت جدواه هو الكبت المناعي لزرع الكلى. ففي خلال صيف عام ١٩٨٦، وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية على أن يعطى أول جسم مضاد أحادي الاستساخ إكلينيكي للمرضى. وهذا الجسم المضاد الذي أنتجته شركة أرثو الدوائية Ortho Pharmaceutical Company في راريتان بولاية نيوجرسي بالولايات المتحدة، قد تم توجيهه ضد الخلايا المناعية التي تسبب رفض الطعم

لنسيجي ،وسوف يعالج به مرضى زرع الكلى الذين يعانون من سلسلة عمليات رفض.

اكتشاف الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

The discovery of monoclonal antibodies

بدأت قصة الجسم المضاد أحادى الاستنساخ فى عام ١٩٧٤، عندما كان جورجيه كوهلر Georges Kohler وقيصر ميلشتين Cesar Milstein من معمل البيولوجيا الجزيئية التابع لمجلس الأبحاث الطبى MRC فى كمبردج بإنجلترا، يدرسان ما كانت تعتبر آنذاك إحدى المشكلات القائمة فى المناعة المتعذرة الحل. والأجسام المضادة هى جزء من دفاعات الجسم ضد الأجسام الغريبة، التى تشتمل الكائنات العضوية المسببة للمرض. فعندما تحفز الخلايا اللمفية B٢ بالجهاز المناعى من خلال وجود كائنا مسبب للمرض أو من مادة غريبة أخرى، فإنها تنتج أجساما مضادة، وهى البروتينات التى تتعرف وترتبط بدقة بالمادة التى تسببت فى البداية على تحفيز إنتاجها. ويؤدى هذا الارتباط ما بين الجسم المضاد والمستضد (المستضد antigen، هو الاسم الذى يطلق على أى مادة تحفز إنتاج الجسم المضاد) إلى تدمير المستضد .

قيصر ميلشتين: (١٩٢٧-) عالم بيولوجيا جزيئية بريطانى، ولد فى بويس أيرس بالأرجنتين. كانت أبحاثه الأساسية فى إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. وقد شارك فى الحصول على جائزة نوبل فى علم وظائف الأعضاء أو الطب عام ١٩٨٤.

الخلاية اللمفية: نوع من خلايا الدم البيضاء، توجد فى الدم والأوعية اللمفية والطحال والعقد اللمفية. وتتصف الخلايا اللمفية إلى خلايا لمفية B مستمدة من نخاع العظم (خلايا B) والخلايا اللمفية المستمدة من الغدة التيموسية (الخلايا T). ولهذا الخلايا دورا أساسيا فى إنتاج الأجسام المضادة.

والمشكلة هي أن الجهاز المناعي يمكنه أن ينتج أجساما مضادة لسلسلة ضخمة من المستضدات . ويحتوى المستودع الكامل من الأجسام المضادة على ما يربو عشرة ملايين جسما مضادا من أنواع مختلفة، وليست مجموعة العوامل الوراثية الحيوانية بالاتساع الكافى حتى تحتوى على جينات فردية لكل بروتينات الأجسام المضادة المحتملة. وبدا ذلك تحدى أمام أحد العقائد الرئيسية للبيولوجيا الجزيئية من أنه يوجد جين متفرد لكل سلسلة بروتين.

بيد أنه يمكن إنتاج جزءا على الأقل من تنوع الجسم المضاد، خاصة وإن كانت جينات الأجسام المضادة تميل للتطفر. فلو كانت الجينات تطفر بحرية مثلما تتضاعف الخلايا اللمفية B، فستكون النتيجة تنوعا من الجينات بأعداد كبيرة.

كان كوهلر ومليشتين يحاولان تحديد الدور، إن وجد، الذى تلعبه الطفرات الجينية فى إنتاج الأجسام المضادة المختلفة. وفى بادئ الأمر، كانا يرغبان فى سلالة من الخلايا يمكنها أن تنمو فى المزرعة، وتنتج نوعا واحدا من جزيء الجسم المضاد استجابة لمستضد معروف. ولم يكن شيئا من هذا القليل متاحا فى ذلك الوقت، حيث لا يمكن الاحتفاظ بالخلايا الطبيعية المنتجة للجسم المضاد فى المزرعة لأكثر من بضعة أيام .

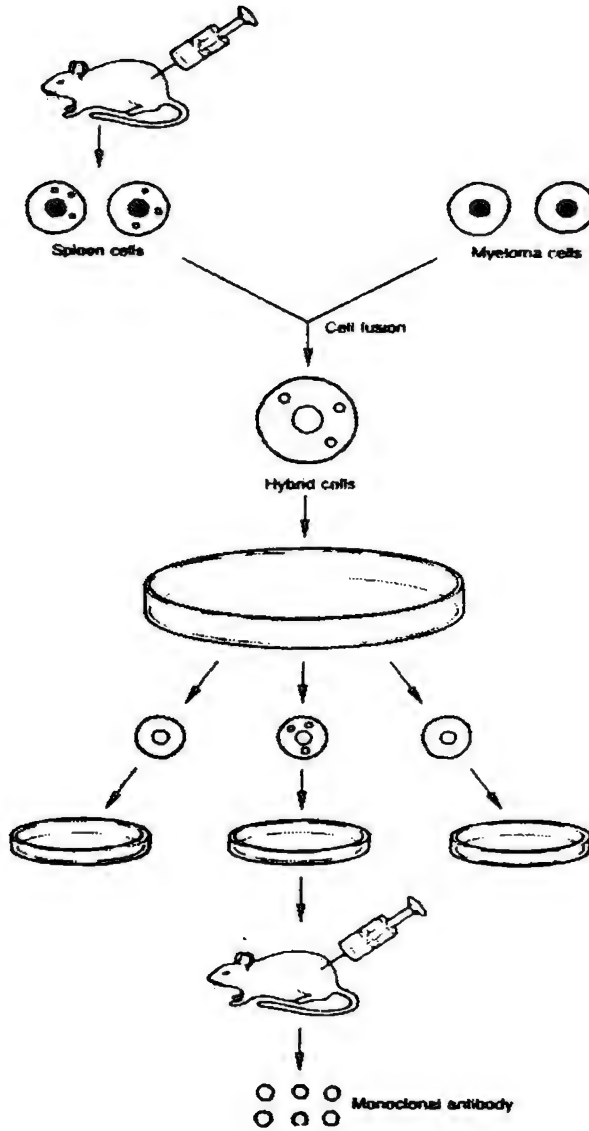
وكانت الأجسام المضادة تنتج بصورة طبيعية عن طريق حقن مستضد فى جسم حيوان وجمع الأجسام المضادة الناتجة من دم الحيوان. ويستخرج هذا الحقن خليطا متغيرا "متعدد الاستساخ" من جزيئات أجسام مضادة مختلفة، على الرغم من أنها تتعرف جميعا على المستضد الذى استثارها.

وطرأت على بال كوهلر وميلشتين فكرة دمج الخلايا المنتجة للجسم المضاد مع خلايا من الأورام السرطانية تعرف بالأورام النخاعية myelomas. وقبل ذلك بسنوات عديدة، استحث مايكل بوتّر Michael Potter من المعهد القومى للسرطان National Cancer Institute فى بئسدا بولاية مرييلاند سلسلة من هذه الأورام، التى استمدت من الخلايا المنتجة للأجسام المضادة فى الفئران. والخلايا من أورام نخاعية معينة هى خلايا استنساخية، أى أنها تتحدّر جميعا من نفس الخلية الأب الأصلية، وتفرز جميعها نفس النوع من جزيء الجسم المضاد. ومع ذلك، فقد كانت غالبية المستضدات التى تعرفت عليها الأجسام المضادة للأورام النخاعية غير معروفة، وكانت محاولة التعرف على المستضد المناسب من عدد كبير جدا من الاحتمالات أمرا صعبا، هو أقل ما يقال .

بيد أن خلايا الأورام النخاعية يمكن حثها على النمو فى مزرعة، وفكر كوهلر وميلشتين أنه إذا أمكنهما إدماج خلايا الأورام النخاعية مع خلايا أخرى منتجة للأجسام المضادة لها تخصص معروف، فقد يتمكنّا من الحصول على سلالة دائمة من الخلايا تنتج الجسم المضاد الذى يحتاجون إليه. وللحصول على خلايا منتجة للأجسام المضادة لها تخصص معروف، قام كوهلر بحقن الفئران بخلايا دم حمراء حصلا عليها من خروف، وتعتبر شديدة المستضدية، وجمعا الخلايا اللمفية B من طحال الحيوان ثم دمجا خلايا B مع خلايا الأورام النخاعية. وعندما استنسخت الخلايا المهجنة الناتجة، ظهر أن بعض المستنسخات تنتج أجساما مضادة تتعرف بصورة محدّدة على خلايا الدم الحمراء للخروف (شكل ١٢-١).

وتنتج كل هجن المستنسخ الواحد نفس جزيئات الجسم المضاد-ومن ثم جاء اسم الجسم المضاد أحادى الاستنساخ. وأصبحت تعرف خلايا الهجين بأورام الهجين hybridomas. وعلى الرغم من أن أورام الهجين الأصلية التى صنعها كوهلر وميلشتين أنتجت جسمين مضادين، أحدهما من خلية الورم النخاعى والأخرى من خلية طحال التى أدمجت معها خلية الورم النخاعى، إلا أن الباحثين يستخدمون حاليا خلايا الورم النخاعى التى لا تنتج أية أجساما مضادة بنفسها، بحيث أن المنتج الوحيد لمستنسخ ورم الهجين هو الجسم المضاد من خلية الطحال.

ويمكن الاحتفاظ بمستنسخ خلية ورم الهجين بصورة غير محددة فى المزرعة، وبذلك جعل بحث كوهلر وميلشتين من الممكن إنتاج كميات كبيرة غير محدودة من الأجسام المضادة النقية ذات تخصص معروف. وبالرغم من أن الباحثين قد صرفا بحثهما لمسألة علمية بحثة، فمن المؤكد أنهما كانا يدركان أبعاد اكتشافهما. وعندما بعث كوهلر وميلشتين بنتائج بحثهما إلى مجلة Nature الصادرة فى السابع من أغسطس عام ١٩٧٥، ذيلا بحثهما بالحديث عن الهجن: "أن هذه الخلايا يمكن زراعتها فى المعمل فى مزارع ضخمة لتوفير جسم مضاد محدد. ويمكن الاستفادة من هذه الخلايا فى الاستخدام الطبى والصناعى". تلك التنبؤ الذى يؤيد بما لا يدعو للشك نتائج أبحاثهما. ولهذا الإنجاز العظيم، نال كوهلر وميلشتين جائزة نوبل عام ١٩٨٤ فى الفسيولوجيا أو الطب، اللذان شاركهما فيها نيلز جرن Niels Jerne من معهد بازل للمناعة بسويسرا، الذى قام بإسهامات نظرية كبيرة فى أبحاث المناعة.



شكل ١٢-١ إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. يتم حقن فار بأى مستضد مرغوب للحث على إنتاج الجسم المضاد.

بعد ذلك تجمع الخلايا المنتجة للأجسام المضادة من طحال الحيوان وتُدمج مع خلايا الورم النخاعي للفأر لتكوين الخلايا الهجين، التي تنمو في المزرعة. ثم تنمو بعد ذلك هجن فردية في مزرعة لتكوين مستنسخات يتم اختبارها من أجل إنتاج الجسم المضاد الذي يتفاعل مع المستضد الأصلي. وقد تحقق بعد ذلك خلايا من المستنسخات التي تنتج الجسم المضاد في الجوف الصفاقي peritoneal cavity لفأر آخر، حيث تكون ورمًا، الورم الهجين. وتفرز الخلايا الورمية للجسم المضاد في السائل الذي يتجمع في التجويف البطني. ويجمع الجسم المضاد أحادي الاستنساخ من هذا السائل. ويمكن تجميد بعض الخلايا المستنسخة المنتجة للجسم المضاد أحادي الاستنساخ أيضًا، لاستخدامها في المستقبل.

تطبيقات الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

Applications of monoclonal antibodies

لقد تبين بالدليل القاطع أن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ على درجة كبيرة من النفع للأبحاث المناعية والجزيئية. ومن جملة استخداماتها العديدة عزل البروتينات، وتظهر فائدتها كذلك في استنساخ الجين. ومن إحدى المشكلات الغاية في الصعوبة لاستنساخ الجين هي التعرف على الخلايا التي تحتوي على الجين المرغوب. فإذا توفر جسم مضاد أحادي الاستنساخ يتعرف على المنتج الجيني، فيمكن استخدامه كمجس للكشف عن تلك الخلايا التي تصنع المنتج ومن ثم تحتوي على الجين.

بالإضافة إلى ذلك، أسهمت الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ إسهاما عظيما في تحديد الأنواع العديدة المختلفة من الخلايا التي تشارك في الاستجابات

المناعية، وفي توضيح تفاعلاتها. ويحتوى الجهاز المناعى بالإضافة إلى الخلايا B على نوع رئيسى آخر من الخلايا اللمفية يعرف بالخلايا T. ففي حين أن من بين وظائف خلايا B الرئيسية إنتاج الأجسام المضادة، فخلايا T بضعة وظائف مختلفة. فالبعض منها خلايا فتاكة يمكنها أن تهاجم مباشرة الخلايا التى تكشف أنها غريبة. وتشمل هذه الخلايا الغريبة على الخلايا المصابة بالفيروس ولعلها الخلايا السرطانية. وتعتبر الخلايا اللمفية T منظمات مهمة أيضا للاستجابات المناعية، ومن جملتها إنتاج الأجسام المضادة التى تصنعها الخلايا B. وتشمل الخلايا T المنظمة على المساعدات helpers والتى كما يوحى اسمها، تعمل على تنشيط الاستجابات المناعية، كما تشمل الكابحات suppressors ذات التأثيرات الكابحة.

وأثبت استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستساخ أن الأنواع العديدة من خلايا T تحمل مستضدات أو علامات على سطوحها، تسمح بأن يميز نوع من نوع آخر. وقد ساعدت الأجسام المضادة أيضا فى تحديد التغيرات التى مرت بها الخلايا B والخلايا T أثناء تطورها.

كبح الاستجابات المناعية

Suppressing immune responses

وإحدى ثمرات البحث فى علامات الخلية T،هى تطوير الجسم المضاد أحادى الاستساخ الذى يجرى استخدامه حاليا فى منع رفض الكلى المنقولة . فهذا الجسم المضاد الذى يباع فى السوق حاليا تحت اسم Orthoclone OKT-3، يتفاعل بشكل محدد مع المستضد "OKT-3"، الموجود على كل خلايا T.

ولمنع رفض النسيج الغريب، يتناول مرضى زرع الكلى بصورة دورية عقاقير لكبح أنشطة أجهزتهم المناعية. وعلى الرغم من ذلك، فإن حوالى ٦٠% من جملة ٧٠٠٠ مريضا، الذين يقومون بعمليات زرع كلى كل عام فى الولايات المتحدة يواجهون أعراض تهدد بفقدان العضو المنزرع (الكلى).

ويحدث رفض الجزء المنزرع أساسا من خلال تدخل خلايا T . وبالتالي فإن الجسم المضاد Orthoclone OKT-3 يمنع هجوم الخلايا التى تسبب الرفض. وفى تجربة إكلينيكية قومية، أنقذ الجسم المضاد ٩٠% من كلى المرضى الذين كانت تتنابهم أعراض رفض العضو المنزرع. وبالمقارنة، وجد أن العلاج بالعقاقير الكابحة للمناعة له فقط نسبة نجاح ٧٥% من الحالات.

والجسم المضاد أحادى الاستساخ، ليس فقط أكثر فاعلية عن العقاقير فى منع رفض الكلى، لكنه قد يكون أيضا أقل قابلية لإحداث تأثيرات جانبية. فالجسم المضاد لا يكبح إلا خلايا T ، فى حين تكبح العقاقير التى من جملتها المضاد الحيوى cyclosporin وبعض الستيرويدات جميع الأوجه الوظيفية المناعية، ونتيجة لذلك تترك المرضى أكثر عرضة للأمراض المعدية. بالإضافة إلى ذلك، قد

تحدث العقاقير أضراراً مستديمة للكلية. بيد أن الجسم المضاد الأحادي الاستنساخ لا يخلو من التأثيرات الجانبية التي يسببها . فيمكنه أن يسبب الحمى، والقشعريرة، والغثيان، والقيء، وقصر التنفس، وآلام الصدر، على الرغم من أن هذه التأثيرات يمكن أن تتكرر .

وهناك أمراض بشرية عديدة يسببها هجوم ظاهري للجهاز المناعي على أنسجة الجسم. وتشمل حالات المناعة الذاتية autoimmune هذه على الـوهن العضلي الـوخيم myasthaenia gravis ، الذي يتصف بالضعف العضلي المتطور الناتج عن تدمير أنواع معينة من الخلايا العصبية، والالتهاب الجلدي الذئبي الشامل systemic lupus erythematosus، الذي يمكن أن يصيب بعض أعضاء الجسم المهمة مثل، الرئتان والكلية أو المخ بالهجوم المناعي، وإمكانية تصلب الأنسجة المضاعف multiple sclerosis، الذي يصاحبه تدهور متطور للجهاز العصبي المركزي central nervous system.

ويحاول الباحثون تحديد ما إذا كان من الممكن استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ، التي توجه ضد مكونات الخلية المناعية التي قد تكون متضمنة في إثارة الاستجابات المناعية الشاذة، في علاج حالات المناعة الذاتية. وعلى سبيل المثال، وجد الباحثون في مدرسة طب التابعة لجامعة ستانفورد في بالو ألتو بولاية كاليفورنيا، أنه يمكن لهذه الأجسام المضادة أن تكبح تطور حالات مماثلة في الفئران، مثل الالتهاب الجلدي الذئبي الشامل وتصلب الأنسجة المضاعف والوهن العضلي الـوخيم الموجودة في البشر. ولا يزال هذا البحث في مراحله الأولى، ولكنه يعطى على الأقل بداية مشجعة لما قد تصبح في النهاية صورة جديدة من صور علاج المناعة الذاتية.

تشخيص الأمراض المعدية

Diagnosis of infectious diseases

تعتبر تطبيقات التشخيص للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ تطبيقات متقدمة إلى حد بعيد، خصوصا في الاختبارات التي تجرى على سوائل الجسم، مثل عينات الدم والبول. وقد خصص من أجل تتبع الحمل حوالى الثلث من المائة وخمسين جسم مضاد أحادى الاستنساخ التشخيصى التي وافقت عليها هيئة الأغذية والدواء الأمريكية . ويحتوى بول النساء الحوامل على هرمون يسمى المنشط المنسل المشيمى البشرى human chorionic gonadotrophin ، الذى تفرزه المشيمة placenta. ويتيح استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى الهرمونات حاليا تشخيص الحمل مبكرا لفترة تصل لأسبوع أو أسبوعان بعد الحمل conception.

ويجرى حاليا أيضا تحسين تشخيص الأمراض التناسلية venereal diseases من خلال توفر الحصول على الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. فمرض السيلان Gonorrhoea، الذى تسببه الإصابة ببكتيريا نيسيريا السيلان المنوى Neisseria gonorrhoeae والعدوى المتدثرة chlamydia، التى يسببها الطفيل الضمنخلوى من الحراشف البرعمية Chlamydia trachomatis، يعتبران من بين الأمراض التناسلية الخطيرة. وهناك حوالى اثنان مليون حالة مرض سيلان gonorrhoea فى الولايات المتحدة كل عام، وربما تصل حالات الإصابة بالمتدثرة Chlamydia حوالى من ٥ إلى ١٠ مليون حالة فى الولايات المتحدة. وعلاوة على ذلك، فكلتا العدويين يمكن أن تسببا مرض التهاب الحوض pelvic

inflammatory disease، وبذلك تعتبر أن أحد الأسباب الرئيسية لعقم النساء. وتتطلب الحالتين طرق علاج مختلفة، لكنه يصعب التمييز بينهما على أساس أعراضهما التي تعتبر متشابهة تماما في السابق .

وكانت تتطلب الطريقة الأكثر دقة لتشخيص السيلان في النساء أن يجرى استزراع البكتيريا المسبب للعدوى، وهو إجراء يحتاج من يومين إلى ثلاثة أيام. وكان التشخيص المحدد لعدوى المتدثرة من التشخيصات الصعبة جدا، لأن المتدثرة لا تنمو إلا بين الخلايا الحية، وكان يتطلب إتمام إجراء الاختبار مدة تصل من يومين لسبعة أيام. وقد استطاعت طرق الاختبار الجديدة التي تستخدم الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أن تقلل بدرجة كبيرة الوقت المطلوب لتشخيص هذين المرضين التناسليين. وعلى سبيل المثال، أنتج روبرت نوينسكي Robert Nowinski وزملاؤه في مؤسسة النظم الوراثية و مدرسة الطب في جامعة واشنطن في سياتل بواشنطن، أجساما مضادة أحادية الاستنساخ، يمكنها التعرف على نيسريا السيلان المنوى أو الحراشف البرعمية C.trachomatis في غضون ١٥ إلى ٢٠ دقيقة، وسمحت بالتالي يتم العلاج السليم بسرعة أكبر مما كان في يحدث الماضي.

وطور باحثو سياتل أيضا أجساما مضادة أحادية الاستنساخ يمكنها التمييز بين فيروسات وثيقة الصلة ببعضها، مثل فيروس القوباء ١ وفيروس القوباء ٢ (HSV١ و HSV٢). ويمكن أن يسبب كلا هذين الفيروسين أعراضا التهابية ارتجاعية مؤلمة. فعادة يصيب فيروس القوباء ١ منطقة الفم، ويحدث بها القروح الباردة المعروفة، ويصيب فيروس قوباء ٢ أساسا المناطق التناسلية، في حين لا

يكون هذا الاختلاف فى تفضيل موقع الإصابة مطلقا. فحوالى من ١٥ إلى ٢٠ % من العدوى التناسلية يسببها فيروس قوباء ١.

ويعتبر تحديد الفيروس المعين أمرا مهما، لأن الآلام التى يسببها فيروس قوباء ١ فى المناطق التناسلية، أقل تكرارا من الآلام التى يسببها فيروس قوباء ٢، ولأن العقاقير الخاصة المضادة للفيروس قد تكون أكثر فاعلية ضد أحد الفيروسين عن الفيروس الآخر. ويمكن الكشف عن الفيروسات من خلال قدرتها على الفتك بالخلايا المستزرعة، غير أن هذا الاختبار يتطلب مدة حوالى من ٣ إلى ٦ أيام. بعد ذلك هناك اختبارات إضافية مطلوبة لتصنيف الفيروس المكتشف إما فيروس قوباء ١ أو ٢. وتستطيع الأجسام المضادة أحادية الاستساخ تشخيص عدوى فيروس القوباء herpes virus infections وتحديد نوع الفيروس بصورة مباشرة من العينات الإكلينيكية التى يتم الحصول عليها من خلال كشط الخلايا من الآفات. ويقلل هذا مرة أخرى من زمن التشخيص لمدة تتراوح ما بين ١٥ إلى ٢٠ دقيقة.

تشخيص السرطان

Cancer diagnosis

وقد نتج عن توفر الأجسام المضادة أحادية الاستساخ التى تتعرف على مستضدات الخلية المناعية تحسنا فى تشخيص أمراض سرطان الدم والأورام اللمفية، وهى سرطانات الخلايا T و B، اللتان يصعب أحيانا التمييز بينهما. وعلى الرغم من ذلك، فقد يكون التكهن بسرطانات الخلية المناعية مختلفا تماما. فالبعض منها أكثر استجابة للعلاج عن الأخريات ، وتتوقف حياة المرضى على

التشخيص الدقيق والمبكر والبدء السريع بالعلاج المناسب لسرطان الخلية
المناعي المعين. والأجسام المضادة أحادية الاستساخت، التي نتعرف على العديد
من علامات الخلايا المناعية البشرية، والتي طور العديد منها ستيفورات
سكلوسمان Stuart Schlossman وزملاؤه في معهد هارفارد دانا-فاربور
للسرطان في مدينة بوسطن بولاية ماساشوتس، قد وفرت وسيلة لتمييز نوع
الخلية المحدد الذي يسبب خلية سرطانية مناعية، وبذلك يتحدد بدقة النوع المعين
من سرطان الدم أو الورم اللمفي.

ويجرى أيضا تطبيق التخصصات الدقيقة للأجسام المضادة أحادية الاستساخت
في تشخيص الأورام الصلبة، وخاصة السرطانية منها وتشمل الأورام السرطانية
سرطانات الرئة والثدي والقولون والمستقيم، التي تعتبر من أكثر أنواع السرطان
شيوعا في الدول المتقدمة. ويمكن للجراحة التي تقوم باستئصال هذه الأورام
الأولية أن تعالج هذه السرطانات، ولكن إذا انتشرت إلى أنسجة أخرى فلا يمكن
حاليا سوى القيام بالقليل جدا للتخلص من الورم المنبث (metastatic disease) أي
الورم الذي يستشري من موقعه إلى مواقع أخرى بالجسم) وينعقد الأمل في أن
يتيح التخصص الدقيق للأجسام المضادة أحادية الاستساخت الاكتشاف المبكر لكلا
من الأورام الأولية والأورام السرطانية الارتجاعية عما هو ممكن حاليا، وربما
يؤدي إلى معدلات شفاء أفضل.

وفي الاختبارات الأكثر تقدما في الأورام الصلبة يجرى استخدام الأجسام
المضادة أحادية الاستساخت في فحص عينات الدم أو البصاق أو فحص جزء من
النسيج الحي مجهريا، أو فحص المواد التي أفرزتها الخلايا السرطانية. وحتى
الآن ومنذ عدة سنوات، راقب أساتذة الطب حالات المرضى الذين يعالجون من

سرطانات القولون والمستقيم والسرطانات الأخرى، من خلال تحديد تركيزات المستضد السرطاني الجنيني (CEA) في دمائهم . وتفرز هذه السرطانات المستضد السرطاني الجنيني في الدم، على الرغم من أن وجوده هناك لا يعتبر محددا معينا على الإطلاق لوجود الورم الخبيث. فهو ينتج أيضا على سبيل المثال، النسيج الجنيني العادي normal embryonic tissue.

وعلى الرغم من ذلك، فقد ظهرت فاعلية المستضد السرطاني الجنيني كمحدد تكهنى للسرطان، حيث تكون تركيزاته عالية في مصل الدم في المرضى غير المعالجين، وتميل تركيزاته للهبوط بعد إجراء جراحة ناجحة. وتعتبر عودة الأورام مؤشرا لزيادة كميات المستضد السرطاني الجنيني في الدم. وقد حددت في البداية تركيزات المستضد عن طريق مستحضرات الجسم المضاد متعدد الاستنساخ العادي، لكنه جرى استبدال هذه المستحضرات حاليا بعدة أنواع مختلفة أحادية الاستنساخ، والتي تعتبر من الكواشف الأكثر حساسية.

وقد وجه قدر كبير من البحث خلال السنوات العديدة الماضية نحو تمييز الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ التي تتعرف على مستضدات مخصصة لأنواع معينة من الأورام - أورام الثدي أو الرئة على سبيل المثال. ويمكن استخدام هذه الأجسام المضادة بصورة علاجية أو تشخيصية. وتوصل الباحثون الذين أجروا البحث إلى نقطة اتفاق بصفة عامة على أن هذه الخلايا الورمية لا يحتمل أن تنتج مستضدات علامة، التي تعتبر مخصصة بصورة مطلقة لنوع من معين من السرطان. وتبعاً لزيّنون ستلويسكي Zenon Steplewski من معهد ويستار في فيلاديفيا بولاية بنسلفانيا، أنه يمكن أن يوجد دائما مستضد ورمي

ظاهر على خلايا طبيعية أخرى، إذا ما أمعن الباحث بنظرته الفاحصة بقدر كاف.

وعلى الرغم من أنه قد لا يكون هناك شيئاً مثل، مستضدات " محددة للورم"، إلا أن الباحثين استطاعوا تحديد أجساما مضادة أحادية الاستنساخ تتعرف على المستضدات "المصاحبة للورم"، توجد في أنواع معينة من الخلايا الورمية، لكنها نادرا ما توجد في الخلايا الطبيعية . وهذه الأجسام المضادة محددة بشكل كاف للخلايا الورمية لكي يمكن استخدامها في تشخيص السرطان.

وعلى سبيل المثال، فإن ستبلويسكي الذي عمل مع هيلاري كوبرويسكي Hilary Koprowski التي هي أيضا من معهد ويستار، أنتج جسما مضادا أحادي الاستنساخ يتفاعل مع مستضد صنعتته سرطانات القولون والمستقيم، وبواسطة بضعة مسرطانات أخرى في المعدة والأمعاء، والتي من جملتها سرطانات البنكرياس والكبد والمعدة.

وفي دراسة موسعة على مئات المرضى، الذين يعالجون من سرطان القولون والمستقيم، وجدت مجموعة ويستار أن الجسم المضاد الأحادي الاستنساخ يمكن أن يتنبأ برجوع السرطان في بعض المرضى. فتركيز مصل المستضد الذي اكتشفه الجسم المضاد، أصبح مرتفعا لمدة من ٣ إلى ١٨ شهرا قبل أن تصبح الأورام الارتجاعية ظاهرة إكلينيكية .

وقد استطاع روبرت باست Robert Bast وزملاؤه في المركز الطبي بجامعة الدوق في دهرام في نورث كارولينا، أن يحددوا جسما مضادا آخر، أعطى أملا في تشخيص السرطان، وفي هذه الحالة سرطانات المبيض ovarian cancers.

ووجد باحثو الدوق أن تركيز الدم في المستند الذي اكتشفه الجسم المضاد قد ارتفع في أكثر من ٨٠% في مرضى سرطان المبيض، لكنه يرتفع ١% فقط في الأشخاص العاديين. وتوضح هذه النتائج أيضا أنه يمكن استخدام الجسم المضاد أحادي الاستساخ في مراقبة استجابة المرضى للعلاج.

وتحدث سنويا أكثر من ١٢٠٠٠٠ حالة سرطان رئة في الولايات المتحدة، و٩٠% من الأشخاص الذين يصابون بسرطان الرئة يموتون بسبب المرض، الذي ينتشر بشكل متكرر قبل اكتشافه. وكان جون مينال John Minnal وزملاؤه في معهد السرطان القومي NCI في بتسدا بولاية مرييلاند، يعملون في إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستساخ التي قد تساعد على تشخيص سرطانات الرئة.

هناك أربعة أنواع من سرطانات الرئة. ويتطلب أحد هذه السرطانات الأربعة- سرطان الخلية الصغيرة الرئوى (SCLC)- أسلوبا علاجيا مختلفا عن أورام الرئة السرطانية الأخرى. ولما كان سرطان الخلية الصغيرة الرئوى ينبث بصورة مبكرة جدا خلال دور المرض، فلا يمكن إخضاعه للجراحة، لكنه غالبا ما يستجيب لفترة على الأقل للعلاج الكيماوى . ولا تستجيب أورام الرئة السرطانية الأخرى للعلاج الكيماوى ، لكنها يمكن أن تعالج بالجراحة إذا أمكن اكتشافها قبل أن تنتشر.

وأنتج مينال Minnal وزملاؤه في معهد السرطان القومي، جيمس ملشاين James Mulshine وفرانك كينيتا Frank Cuttitta، جسمين مضادين أحاديا الاستساخ اللذان يتعرفان على أكثر من ٩٠% من سرطانات غير سرطانات الخلية

الصغيرة الرئوية، لكنهما لا يرتبطان إلا بحوالى ٢٠% من سرطانات الخلية الصغيرة الرئوية. وطور أيضا جيفرى سكلوم Jeffery Schlom من المعهد القومى للسرطان، ووليام جونستون William Johnston من المركز الطبى بجامعة الدوق وزملاؤهما، جسما مضادا أحادى الاستنساخ يتفاعل مع الخلايا من غير سرطانات الخلية الصغيرة الرئوية. وقد تفيد هذه الأجسام المضادة فى تمييز سرطان الخلية الصغيرة الرئوى عن صور سرطان الرئة الأخرى.

وتقع السوائل الغشائية الجنينية Pleural effusions، التى تعتبر سوائل شاذة، داخل الرئة وحولها، ويمكن أن تحدث سوائل الاستسقاء البطنى ascites fluids التى تقع فى التجويف البطنى abdominal cavity، إما بسبب العدوى، أو بسبب الأورام الخبيثة، خاصة تلك الأورام التى تنشأ فى الثدي أو فى الجهاز التناسلى الأنثوى female genital tract. ويعد التعرف على الخلايا السرطانية فى السوائل الغشائية الجنينية أو فى سوائل الاستسقاء البطنى من الأمور الصعبة، ولكن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ قد تساعد فى هذا المضمار أيضا.

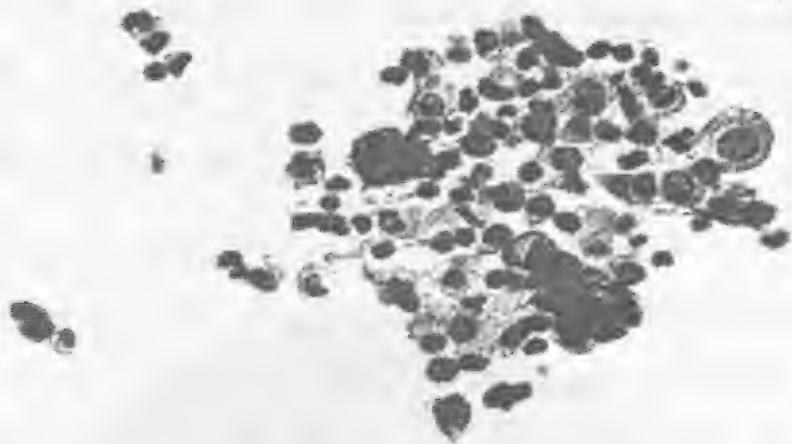
استطاع سكلوم Schlom وجونستون Johnston وزملاؤهما، أن يحددوا جسما مضاد أحادى الاستنساخ، يتفاعل مع خلايا أنواع عديدة من السرطانات، التى من جملتها سرطانات الثدي والرئة والمبايض. وتتل الدراسة المبكرة للجسم المضاد على أنه يكتشف بشكل مؤكد الخلايا السرطانية فى كل من سوائل الاستسقاء البطنى والسوائل الغشائية الجنينية. ويمكن أن يساعد أيضا فى تمييز الخلايا السرطانية فى عينات خزعة يتم الحصول عليها بسحب مادة من الأورام الخبيثة المشكوك فيها، أورام الثدي، على سبيل المثال، بواسطة إبرة وحقنة (شكل ١٢-٢).

وطرق استخدام الأجسام المضادة فى الكشف عن الأورام السرطانية بطريقة مباشرة فى المرضى، تعد أقل تطورا بدرجة كبيرة عن نظم تحليل عينات الدم والعينات الأخرى التى تسحب من الجسم. وتزود الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ المستخدمة للتصوير فى الجسم الحى بمادة إشعاعية وتحقق فى مجرى الدم أو أى مكان آخر فى الجسم. والفكرة هى أن تخصصية الجسم المضاد ستمكنه من البحث عن أى خلايا سرطانية والارتباط بها وتحمل مستضد مناسب، وتركز النشاط الإشعاعى بالتالى فى مواقع الأورام. والطرق السريرية لتحديد تركز الكاشفات الإشعاعية فى الجسم متوفرة إلى حد كبير، على الرغم من أنها لم تصمم فى الأصل كى تستخدم مع الأجسام المضادة الموسومة بالإشعاع .

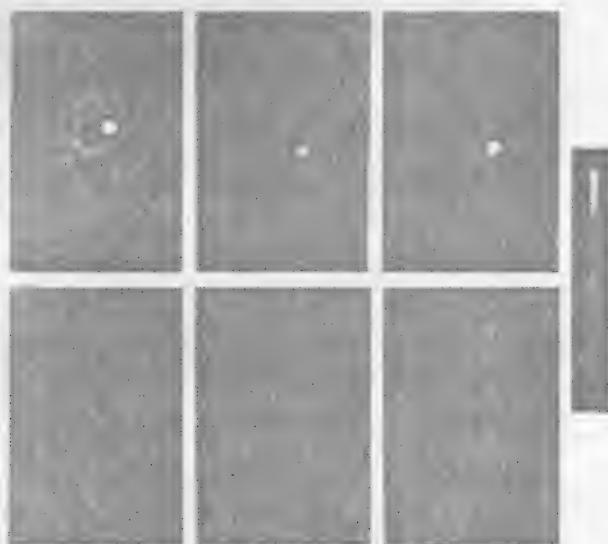
كانت النتائج التجارب الأولية للتصوير داخل الجسم الحى نتائج إيجابية. وأوضحت مجموعات عديدة أن الأجسام المضادة الموسومة بالإشعاع تتركز فى الأورام على الرغم من مزيد من البحث لا يزال مطلوبا قبل استخدام هذه الطرق التصويرية بشكل روتينى فى العيادة (شكل ١٢-٣ و ١٢-٤). وقد وسمت الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى معظم هذا البحث باليود-١٣١، وفى الغالب لأن هذا النظير المشع يعتبر غير مكلف، وقد حصل الباحثون على قدر كبير من الخبرة من خلاله إلحاقه بالبروتينات. وعلاوة على ذلك، فإن إرفاق النظير المشع مع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ قد يكون مفيدا فى العلاج، لأنه يبعث إشعاعا عالى الطاقة.

وعلى الرغم من ذلك، لا يعتبر يود-١٣١ مثاليا فى التصوير التشخيصى، حيث تميل بعض الأجسام المضادة إلى التخلص منه، ولا تستطيع أجهزة التصوير الحالية أن تكتشفه بطريقة فعالة. ولهذا السبب بدأ الباحثون فى تطوير

طرق لوسم الأجسام المضادة أحادية الاستساخت بنظائر مشعة تعتبر أكثر ملاءمة للتصوير.

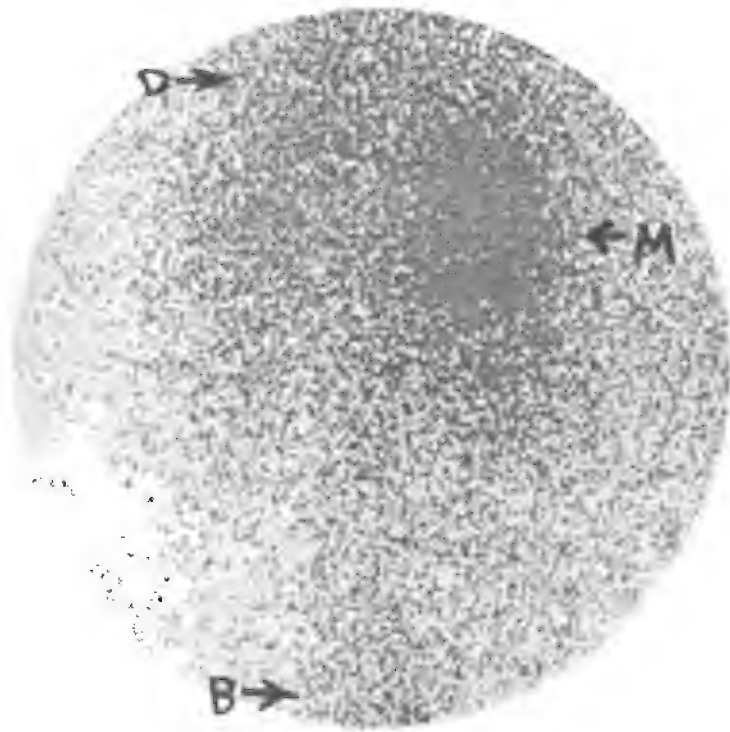


شكل ١٢-٣ خلايا الموانئ الغشائية الجنينية مشعوبة بجسم مضاد أحادي الاستساخت يتعرف على الخلايا السرطانية. وتم الحصول على الخلايا من مريض كان يشك في أنه مصاب بسرطان الصدر. وتوضح بعض الخلايا المصطفية باللون البني المحمر أنها تفاعلت مع جسمًا مضادًا أحادي الاستساخت وبذلك تعتبر خلايا أورام سرطانية.



شكل ١٢-٣ استخدام جسم مضاد أحادي الاستساخت في تحديد الخلايا السرطانية البشرية التي استزعت في المختبر.

و يتعرف الجسم المضاد الموسوم بمادة اليود المشعة على مستضد موجود في خلايا القولون، ولا يوجد في خلايا ورم النخاع. وتركيز الجسم المضاد على ورم القولون يمكن الكشف عنه خلال اليوم الأول من الحقن. ولا تزال هناك ثلاثة أيام بعد الحقن عندما يشاهد نشاطا إشعاعا أقل في الدم . ولا يتركز الجسم المضاد في ورم النخاع.



شكل ١٢- الكشف عن السرطان المنبث في كبد مريض. ويشمل هذا المنظر للفحص بأشعة جلفا على البطن كلها بدءا من الحجاب الحاجز (D) إلى المنقطة (B). ويتركز الجسم المضاد الموسوم بالإشعاع في الكبد (M)، وبالتالي يظهر وجود السرطان في هذا العضو.

علاج السرطان

Cancer therapy

وقد تستخدم الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى النهاية ،ليس مجرد فى الكشف عن الخلايا السرطانية ولكن فى إبادتها .وينعقد الأمل على الأجسام المضادة لما لها من تخصص، فى أن تكون تأثيراتها الجانبية الضارة أقل من طرق العلاج الأكثر تقليدية التى يستخدم فيها العقاقير والإشعاع،والتى غالبا ما تتلف الخلايا الطبيعية وكذلك الخلايا السرطانية. ومع ذلك، لا يحتمل أن يكون تخصص الأجسام المضادة مطلقا،لأن المستضدات التى تتعرف عليها لا تقتصر فقط على الخلايا الورمية.

وقد بدأ الباحثون فى بعض المراكز الطبية قبل ذلك بمحاولات إكلينيكية للعلاج بالأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. وكما هى الحالة عادة فى المحاولات الأولى لأى علاج تجريبى،فقد كان كل المرضى فى هذه الدراسات من الذين يعانون من أنواع سرطان متقدم لم تستجب لأنواع العلاج التقليدية. وعلى الرغم من هذا برزت نتيجتان واعدتان : وهى أن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أحدثت على الأقل خمودا جزئيا للورم فى بعض المرضى، وتحمل الأشخاص الذين العلاج بالأجسام المضادة بصورة طبيعية.

ووفقا لسكولوم،فإن عدة مئات من الأشخاص قد عولجوا حتى الآن فى العديد من المراكز الطبية،وكانت التأثيرات الجانبية للعلاج بالجسم المضاد،والتى اشتملت الغثيان والقيء والإسهال والحمى والقشعريرة تأثيرات جانبية معتدلة، ولم يتوفى أى من المرضى الذين كانت حالتهم خطيرة جدا بسبب العلاج

التجريبى. وأظهرت الخبرة الطويلة فى التجارب الإكلينيكية أن العوامل العلاجية الجديدة الفعالة قد تسبب وفيات عرضية، عندما يتم اختبارها فى المرضى الموهنين نتيجة لتقدم المرض، لكن هذا لم يحدث حتى الآن مع العلاج بالأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

ويجرى استكشاف بعض الاستراتيجيات للاستخدام العلاجى للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ من خلال الدراسات. وفى البعض منها استخدمت الأجسام المضادة المجردة. ويعتمد تدمير الخلايا الورمية حينئذ على قدرة الجسم المضاد على الارتباط بالخلايا، وإحداث آليات الفتك الطبيعية فى الجهاز المناعى. وفى إحدى هذه المحاولات، قام هنرى سيرز Henry Sears من المركز الطبى فوكس شيز Fox Chase Cancer Centre فى فيلاديفيا بإعطاء جسم مضاد أحادى الاستنساخ ضد سرطان القولون والمستقيم، الذى صنعه مجموعة كوبرويسكى-ستبلويسكى، لمرضى سرطان البنكرياس أو القولون والمستقيم، ولوحظ انحسار الورم فى بعض المرضى.

وهناك طريقة أخرى لاستخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى علاج السرطان، وذلك عن طريق إقران الأجسام المضادة بالعقاقير القاتلة للخلية أو بسموم أو نظائر مشعة. ويستخدم الجسم المضاد فى تلك الحالة فى تركيز العامل القاتل فى الورم، بينما لا تتعرض الخلايا الطبيعية كثيرا للإشعاع. وعلى سبيل المثال، بدأ رالف ريسفيلد Ralph Reisfeld وزملاؤه فى عيادة سكريس ومؤسسة الأبحاث فى لا جولا فى كاليفورنيا محاولة تجريبية مع مرضى سرطان الرئة بواسطة جسم مضاد أحادى الاستنساخ الذى تم ربطه بالعقار العلاجى الكيماوى methotrexate. ونتج عن ذلك أن انكمش الورم فى حالتين من إحدى

عشرة حالة من المرضى الذين داوموا على العلاج. وعلى الرغم من أنه سابق الأوان الحصول على أية نتائج قوية عن كفاءة العلاج من خلال رفع العقار بالجسم المضاد أحادى الاستساخ، إلا أن العلاج به يسمح بإعطاء جرعات أكبر للمرضى عن الجرعات المعتادة من عقار methotrexate الكيماوى شديد السمية.

والخروج ricin هو بروتين بذرة نبات الخروج من البروتينات قوية السمية، حيث يمكن لجزيء واحد أن يقتل خلية. ووجدت عدة مجموعات اشتملت على ألين فيتيتا Ellen Vitetta وجونثان أوه Johnathan Uhr فى المدرسة الطبية الجنوبية الغربية بجامعة تكساس فى دالاس وريتشارد يول Richard Youle فى المعهد القومى للاضطرابات العصبية والاتصالية Neurological and communicative Disorders وستروك Stroke فى بتسدا بماريلاند، إن إرفاق الخروج مع الأجسام المضادة أحادية الاستساخ يمكن أن يقتل خلايا سرطان الدم فى المزرعة وفى حيوانات التجارب.

يجب أن تدخل العقاقير والسموم إلى الخلايا إن كانت ستحدث تأثيراتها القاتلة. ومع ذلك، فيمكن للإشعاع أن يقتل خلية من خارجها، وقد يكون له نتيجة ذلك، ميزة تفوق العوامل الأخرى عندما يوجه بواسطة الأجسام المضادة أحادية الاستساخ. ولا تزال جهود جارية تبذل لتقييم الإمكانيات العلاجية الفعالة لإرفاق الأجسام المضادة الأحادية الاستساخ والنظائر المشعة فى عدة معامل مختلفة. وقد حصل ستيفن روسن Steven Rosen من الجامعة الشمالية الغربية فى شيكاغو بولاية ألينوى على تسكين قصير الأمد لآفات البشرة التى يسببها ورم الخلية اللمفية T، فى اثنين من خمسة مرضى قام بعلاجهم بهذا الإرفاق.

بالإضافة إلى ذلك، فقد حصل ستانلى اوردر Stanley Order فى مدرسة الطب بجامعة جونز هوبكنز فى بلتيمور بمريلاند على تسكين جزئى أو كامل لحوالى ٥٠ إلى ١٠٠% من المرضى الذين علاجهم من سرطان الكبد بمركب من يود إشعاعى مع جسم مضاد، على الرغم من استخدام أوردر لمستحضر من جسم مضاد متعدد الاستنساخ بدلا من الجسم المضاد الأحادى الاستنساخ.

واستطاع رونالد ليفى Ronald Levy وريتشارد ميللر Richard Miller وزملاؤهما فى مدرسة الطب بجامعة ستانفورد، أن يحققوا واحدا من العلاجات القليلة لمرضى بالسرطان بواسطة العلاج بالجسم المضاد أحادى الاستنساخ. واستتب هؤلاء الباحثون استراتيجية غير عادية لعلاج الورم اللمفى للخلية B. وكانت تستق خلايا هذا السرطان من الخلايا المنتجة للجسم المضاد، ولذلك تحمل على سطوحها جزيئات من الجسم المضاد صنعتها الخلية الأصلية. وعلاوة على ذلك، وبما أن الأورام اللمفية للخلايا B، أوراما استنساخية، فيجب أن تحمل جميع الخلايا الورمية نفس الجسم المضاد. وقد جاءت هذه الأورام باستثناء الحالة الأكثر عمومية، التى لم توجد فيها مستضدات محددة الورم بصورة مطلقة. فكل ورم لمفى للخلية B، يحمل مستضاده الورمى الوحيد، أى الجسم المضاد .

والأجسام المضادة هى بروتينات، ومثل كل البروتينات الأخرى تستطيع أن تستجلب إنتاج الجسم المضاد. وكانت طريقة مجموعة ليفى فى علاج الأورام اللمفية، هى جعل الجسم المضاد الأحادى الاستنساخ يتعرف بصورة محددة على الجسم المضاد الموجود على خلايا الورم اللمفى. وتتطلب هذه الاستراتيجية بخلاف الاستراتيجيات الأخرى التى يجرى اختبارها، جسما مضادا أحادى الاستنساخ مختلفا لكل مريض. وقد حدث لأول مريض عولج بهذا الجسم

المضاد إخمادا كاملا للورم، وظل معافى من المرض لمدة وصلت لأكثر من خمس سنوات-والتي تعتبر الحد القياسى للشفاء من السرطان. واستمر ليفى منذ ذلك الحين فى علاج مجموعة من المرضى، لكنه لم يستطع تكرار نجاحه الأول. فقد حدث لبعض المرضى إخمادا جزئيا مؤقتا للورم، فى حين لم يكن هناك شفاء كامل.

كان يجرى الحصول على جميع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ المستخدمة حتى الآن من الفأر، ولما كانت تعتبر بروتينات غريبة، فغالبا ما كانت تبعث على تكون جسم مضاد فى المرضى. وقد تنقص الأجسام المضادة الموجودة فى المرضى من فعالية الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ العلاجية التى من مصدر الفأر، وقد يكون هذا سببا إلى حد ما فى فشل معظم استجابات مرضى ليفى للعلاج.

إلا أنه من المحتمل أن تكون المشكلة الرئيسية قد نشأت من طبيعة جينات الجسم المضاد، حيث يتكون كل جزيء من الجسم المضاد من أربعة بروتينات: سلسلتان ثقيلتان متماثلتان ذات وزن جزيئى ٥٠٠٠٠ لكل منهما، وسلسلتان متماثلتان خفيفتان ذات وزن جزيئى ٢٣٠٠٠ لكل منهما (شكل ١٢-٥ و ١٢-٦). ويمكن أن تنقسم كل سلسلة خفيفة وكل سلسلة ثقيلة إلى منطقة ثابتة constant region، وكما يوحى اسمها، تكون متماثلة فى كل السلاسل من نفس النوع، وإلى منطقة متغيرة variable region، تختلف من سلسلة لسلسلة تالية لها. ويكون اتحاد المناطق المتغيرة من السلاسل الخفيفة والثقيلة موقعى ارتباط لمستضدين فى جزيء جسم مضاد. وتعتمد هذه القدرة لجزيئات الجسم المضاد فى التعرف على

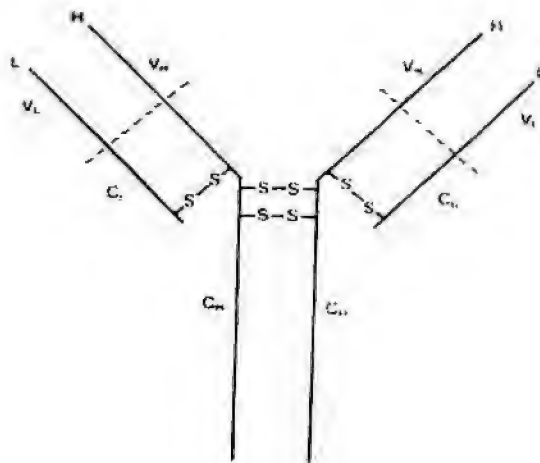
العديد من المستضدات نتيجة لذلك على نشوء عدد كبير جدا من المناطق المتغيرة.

ومنذ السنوات التى بدأ فيها كوهلر وملشئين تجاربهما عن دور الطفرات فى نشوء تنوع الجسم المضاد، فقد أظهرت دلائل كبيرة على أن مناطق معينة من التسلسلات الجينية المشفرة عن المناطق المتغيرة للجسم المضاد، كانت تميل للتطفر، وأن هذه الطفرات هى السبب فى جزء من تنوع الجسم المضاد. وكما يحدث، فقد كانت الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ التى استخدمها ليفى وزملاؤه موجهة بشكل محدد إلى المناطق الميالة للتطفر من الأجسام المضادة المستهدفة على خلايا الورم اللمفى. ولما كانت الطفرات تغير من شكل الأجسام المضادة المستهدفة، فلم تعد تستطيع التعرف على الجسم المضاد الأحادى الاستنساخ العلاجى. ونتيجة لذلك، لم تقتل كل الخلايا الورمية، وتوقف تقدم الشفاء من المرض بشكل مؤقت، إن لم يكن توقفا دائما. ومن الواضح أن المريض الأول الذى عالجه ليفى كان من المرضى المحظوظين .

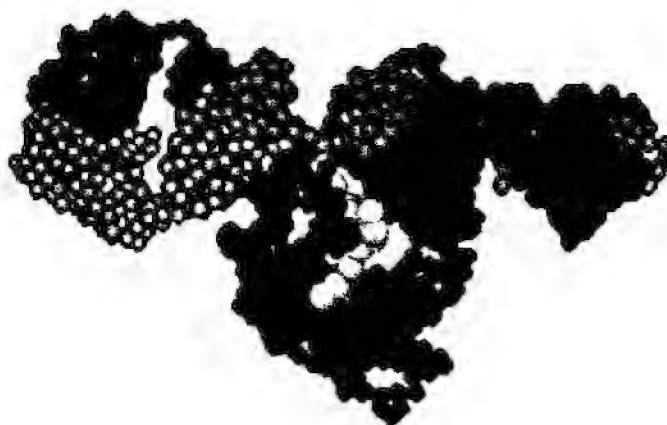
والأشخاص المصابون بأورام لمفية أو بسرطان دم ،والذين لم يستجيبوا للعلاج الكيماوى أو الإشعاع، فقد تجرى لهم عمليات زرع نخاع العظم، فى محاولة أخيرة لإنقاذ حياتهم. وقبل أن يجرى هذا العلاج، يجب تدمير النخاع العظمى للمرضى بواسطة العقاقير أو الإشعاع للتخلص من مصدر الورم الخبيث. ويؤدى هذا العلاج أيضا إلى عجز المريض عن تكوين الدم الطبيعى، ذلك التأثير الذى يصبح قاتلا، أن لم يكن النخاع العظمى المنزوع نشطا.

ويمكن أن تكون عمليات زرع نخاع العظمي bone marrow transplants شديدة الخطورة . ويمكن مصدر الخطر الرئيسى فى مرض "رفض العضو المنزرع" graft-versus-host،والذى تقوم فيه الخلايا المناعية الناتجة من زرع النخاع بمهاجمة خلايا المريض. وقد تكون النتيجة إتلافا كبيرا لنسيج الخلايا،وربما تؤدى الحالة إلى الوفاة . ولتقليل خطورة هذا المرض،يجب أن يتوافق تكوين مستضد خلايا الواهب توافقا شديدا مع خلايا تكوين مستضد المريض. والطريقة الأخرى لمحاولة منع مرض رفض العضو المنزرع graft-versus-host،هى معالجة نخاع العظام قبل زرعه بواسطة جسما مضادا أحادى الاستساخ،يتعامل مع الخلايا المسببة للهجوم المناعى فى نسيج جسم المريض.

إلا أنه لا يوجد دائما الأشخاص المناسبين الواهبين لنخاع العظام لكل مريض يستفيد من زرع النخاع. وربما تساعد الأجسام المضادة أحادية الاستساخ فى هذا المضمار أيضا. والفكرة هنا،هى إزالة بعض من نخاع عظم المريض،قبل أن يتعرض للجرعة المدمرة المبيدة لنخاع العظم،سواء بالكيمائيات أو بالإشعاع. بعد ذلك ينظف نخاع العظم من خلايا سرطان الدم بالعلاج بمستحضر مناسب من جسم مضاد أحادى الاستساخ،ويعاد إدخاله إلى المريض. وفى إحدى المحاولات المبكرة بهذا العلاج،استطاع لى نانلر Lee Nadler الذى يعمل فى معهد سرطان دانا-فاربر،أن يخدم الورم فى كل الأربعين مريضا بالورم اللمفى الذين عالجههم حتى الآن. وظل منهم حوالى ٦٠% معافون تماما من المرض لمدد تصل إلى أربعة سنوات.



شكل ١٢-٥ رسم يوضح جزيء جسم مضاد. تتكون جزيئات الجسم المضاد من أربعة سلاسل بروتينية: سلسلتان ثقيلتان (H) وسلسلتان خفيفتان (L). يرتبط السلاسل ببعضها كما هو مبين بروابط الديسلفايد بين بقايا الحمض الأميني سيستين. وتحتوي كل سلسلة خفيفة وسلسلة ثقيلة على منطقة متغيرة (VH و VL) ومنطقة ثابتة (CH و CL). ويحتوي جزيء الجسم المضاد على موقعين ربط بالمستضد، واللذان يتكونان من مناطق متغيرة من السلاسل الثقيلة والخفيفة.



شكل ١٢-٦ نموذج لجزيء جسم مضاد. تظهر في هذا الشكل السلاسل الثقيلة باللون الأزرق والبرتقالي والسلاسل الخفيفة باللون الأخضر. ويحتوي شراعي الجزيء اللذان يتخذان شكل حرف Y، على مواقع ربط بالمستضد. ويدل اللون الأصفر على بقايا الكربوهيدرات التي تتصل بروتين الجسم المضاد.

مواطن ضعف محتملة فى العلاج بالأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

Potential limitations on therapy with monoclonal antibodies

على الرغم من أن الدراسات الإكلينيكية قد قدمت بعض الاكتشافات المشجعة، إلا أنها قد أشارت أيضا إلى بعض المشاكل التى تحتاج سوف تحتاج إلى حل قبل أن يمكن اعتبار العلاج باستخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ كل شيء. إلا أن يكون علاجا تجريبيا إلى حد بعيد . وعلى سبيل المثال، فهناك خمسة أنواع رئيسية من الأجسام المضادة، ولا يزال يحتاج الباحثون إلى تحديد ما إذا كانت بعض هذه الأنواع أكثر ملاءمة لتطبيق معين عن بقية الأنواع الأخرى. وتتعلق الأسئلة الأساسية الأخرى التى تتطلب الإجابة عنها بحجم الجرعات التى يجب إعطائها حتى تكون جرعات فعالة، والطريقة الأفضل لإعطاء الأجسام المضادة (كدواء) لضمان وصولها بصورة فعالة إلى مواقع الورم.

ويشكل اختلاف أجناس heterogeneity الخلايا الورمية، ما قد يكون العقبة الكبرى فى استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ لعلاج السرطان. وأظهرت مجموعة دلائل قوية على أن (خلايا الأورام الفردية تختلف فيما يتعلق بسلسلة كبيرة من الخصائص. فقد تتنوع قدرتها على الانبثاث، أو الإفراز أو الاستجابة للهرمونات، وفى مدى تأثرها بالعقاقير العلاجية الكيميائية والإشعاع- وفى تركيب المستضدات على سطوحها (شكل ١٢-٧). فقد تحمل بعض الخلايا مستضد يتعرف عليه جسم مضاد، فى حين قد لا تحمل الخلايا الأخرى مستضد .

وعلاوة على ذلك، فقد يسبب ارتباط جسم مضاد أن يختفى مستضد من على سطح الخلية. وفي تلك الحالة، لن تتأثر الخلايا الباقية بعلاجات الجسم المضاد الأخرى. ويتطلب العلاج الفعال للسرطان أن تقتل جميع الخلايا ولا يتبقى منها شيء لينشأ منه أورام جديدة. في حين أن الخلايا التي تنقصها مستضد مستهدف لأي سبب من الأسباب سوف تتجو من تأثيرات الجسم المضاد عليها. ويأمل الباحثون في أنه يتمكنوا من التغلب على مشكلة اختلاف الأجناس، وربما يكون ذلك باستخدام مزيج من الأجسام المضادة أحادية الاستساخت تتفاعل مع مستضدات عديدة مصاحبة للأورام. وقد يفيد أيضا إقران الأجسام المضادة مع النظائر المشعة، حيث تمتد تأثيرات النظير المشع القاتلة تمتد إلى ما بعد الخلية التي ترتبط بالجسم المضاد.

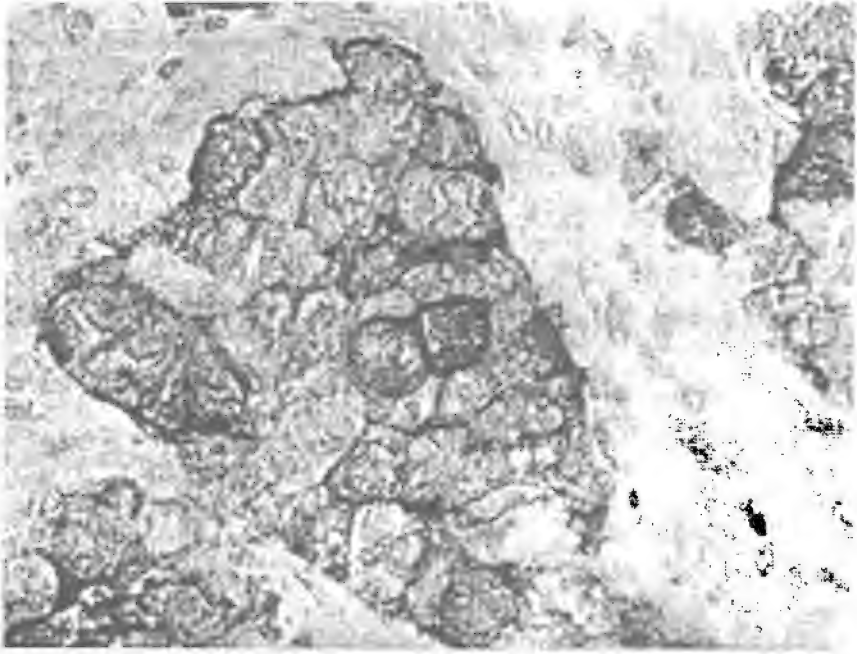
وكما ذكرنا من قبل، فقد استخدمت الأجسام المضادة أحادية الاستساخت المأخوذة من الفأر في جميع في التجارب الإكلينيكية. فإعطاء المرضى البروتينات الغريبة كدواء، وخصوصا عندما تعطى بشكل متكرر، من شأنها أن تحدث حساسية شديدة وربما قاتلة، تسمى بفرط الحساسية anaphylaxis. وقد ثبت أن هذا الخطر المحتمل أقل خطورة مما كان يتوقع في محاولات (تجارب) الجسم المضاد أحادي الاستساخت. وعلى الرغم من أن بعض المرضى قد عانوا من تأثيرات الحساسية بسبب تعاطيهم الأجسام المضادة أحادية الاستساخت المأخوذة من الفأر، إلا أن هذه التأثيرات أمكن علاجها ولم يثبت أن أي منها أنه قاتل.

وحتى لو كانت تفاعلات الحساسية الشديدة تسبب مشكلة للعلاج بالأجسام المضادة أحادية الاستساخت المأخوذة من الفأر، فقد تؤدي التفاعلات المناعية ضد

البروتينات الغريبة رغما عن ذلك إلى تقليل كفاءتها العلاجية. وكان الباحثون يحاولون طيلة سنوات عديدة إنتاج أورام هجين تنتج أجساما مضادة بشرية أحادية الاستساخ، لكن جهودهم لم تكلل حتى الآن بالنجاح.

وتصنع أورام الهجين Hybridomas فى الوقت الحالى بالقدر الذى كانت تصنع به أيام كوهلر وميلشتين. وتحصن الفئران بالمستضد المرغوب، وبعد ذلك تعزل الخلايا المنتجة للجسم المضاد من طحال الحيوانات لإدماجها مع خلايا الورم النخاعي myeloma cells. ومن الواضح أنه لا يمكن الحصول على الخلايا المنتجة للجسم المضاد من البشر بهذه الطريقة.

وقد يكون هناك سبيلا لحل هذه المشكلة، لأن العديد من الأورام تصبب المستضدات فى الدورة الدموية، والتي تؤدي قد تؤدي إلى إحداث استجابة جسماء مضادا. وإدماج خلايا الورم النخاعي مع الخلايا B المنتجة للجسم المضاد من دم مرضى السرطان، يمكن فى هذه الحالة أن تأتي بأورام الهجين التى تنتج أجسام مضادة أحادية الاستساخ بشرية تتعامل مع الخلايا الورمية، ولهذا رأت مجموعة سكولوم أن هذا الأسلوب سينجح. ومع ذلك، فقد كانت التى صنعت من دمج الخلايا B من مرضى سرطان الثدي مع خلايا الورم النخاعي للفأر غير مستقرة، كما هى الحالة دائما بين الهجن مختلفة الأنواع. ولم تطور بعد خلايا الورم النخاعي البشرى التى تعتبر مناسبة لإنتاج الورم الهجين.



شكل ١٢-٧ اختلاف أجسام الخلايا الورمية. يمكن أن تختلف خلايا الأورام البشرية عن بعضها البعض من عدة نواح بما فيها أنواع المستضدات التي تحملها. وعندما صيغ هذا الورم السرطاني في الصنوبر مع مضاد أحادي الاستسماخ، أصبحت بعض الخلايا شديدة الصبغة (البني الغامق)، وأصبحت الأخرى خفيفة الصبغة، ولم يرتبط البعض بالجسم المضاد على الإطلاق. ويمكن أن يمثل هذا الاختلاف في الجسم مشكلة في تجارب علاج السرطان بالأجسام المضادة أحادية الاستسماخ. فبالخلايا التي لا ترتبط بالجسم المضاد قد تنجو من تأثيراته القاتلة، وتظل بالغة وتسبب الورم الخبيث.

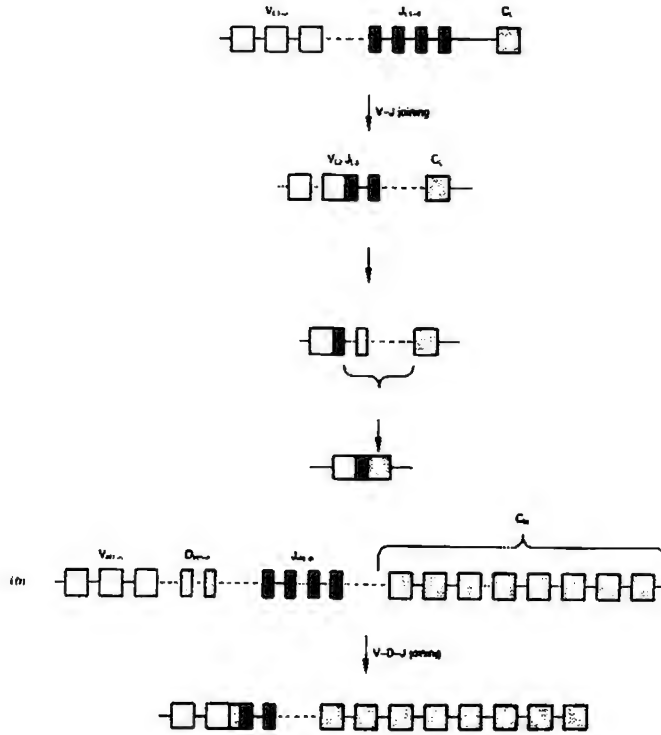
الأجسام المضادة الكيميائية

Chimaeric antibodies

قد يقدم البحث الحديث الذي يقرن ما بين الجسم المضاد أحادي الاستسماخ وتكنولوجيايات الـ د.ن.أ. المطعم وسيلة لصنع أجساما مضادة ستكون أقل احتمالا لأن تعرض على إبطال الاستجابة المناعية للأجسام المضادة المستخرجة من الفئران في البشر. وفي الطبيعة، تتجمع مجموعة جينية كاملة لسلسلة خفيفة من جسم مضاد عن طريق ضم ثلاث قطع مختلفة من د.ن.أ. (شكل ١٢-١٢)

٨). وتكون اثنتان من هذه القطع التسلسل المشفر عن المنطقة المتغيرة، وتشفر القطعة الثالثة عن المنطقة الثابتة من سلسلة البروتين. ويعد جميع السلاسل الثقيلة متشابهة فيما عدا أن ثلاثة تسلسلات الـ د.ن.أ يجب أن تتحد لتكون القطعة الجينية المشفرة عن المنطقة المتغيرة. وهذا التجمع من قطع الـ د.ن.أ الثلاث، هو آلية أخرى من الآليات التي تسمح لجهاز المناعة بتوليد هذا التنوع الهائل من جزيئات الجسم المضاد.

وبمساعدة تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم استطاع الباحثون أن يستفيدوا من خطة الطبيعة في تخليق الجسم المضاد في إنشاء أجساما مضادة بمواصفاتها الخاصة. ومن بين "الأجسام المضادة المصممة" التي يجري صنعها الأجسام المضادة المختلطة، التي تكون فيها المناطق الثابتة من أصل بشري والمناطق المتغيرة من أصل فأر. والاعتبار العام، هو أن الاستجابات المناعية للأجسام المضادة توجه أساسا نحو المناطق الثابتة من الجزيء. ويتعرض الجهاز المناعي لأي فرد فعلا لعدد ضخم من المناطق المتغيرة، والتي من المحتمل ألا تكون معروفة بسهولة مثل المناطق الثابتة.



شكل ١٢-٨ مجموعة كاملة من جينات الجسم المضاد. (a) تتجمع جينات السلسلة الخفيفة من ثلاث قطع مشفرة منفصلة، وتسمى (V) منطقة متغيرة و (J) منطقة اتحاد و (C) منطقة ثابتة. وتشفر المنطقة المتغيرة الكاملة لسلسلة البروتين الخفيفة في القطع V و J، وللتنظيم ببعدها أثناء نضج الخلايا المنتجة للجسم المضاد. وخلال هذا الاتحاد يمكن أن توصل أي من قطع V العديدة بأى من قطع J، وتساهم بالتالي في تنوع جزيئات الجسم المضاد. وتظل القطعة المتصلة V-J منفصلة عن قطعة المنطقة الثابتة إلى أن ينسخ نطاق الدن. أ. كله في رن. أ. الرسول، وفي ذلك الوقت ينصل رن. أ. بين قطعتي V-J و C. (b) تشبه تجميع السلسلة الكاملة الثقيلة للجينات سلسلة الجينات الخفيفة، لهما عدا قطع الدن. أ. الثلاث V-J و D (للتنوع) - تكون مطلوبة لتشفير عن المنطقة المتغيرة للسلسلة الثقيلة. بالإضافة إلى ذلك، توجد عدة مناطق ثابتة مختلفة. ويتحدد نوع الجسم المضاد المنتج الأخير، والذي يصبح متصلاً بواسطة المناطق الثابتة بالقطعة الكاملة V-D-J.

والباحثون الذين شاركوا في تطوير تكنولوجيا الجسم المضاد الكيميري هم: شيرى موريسون Sherie Morrison من كلية الأطباء والجراحين فى جامعة كولومبيا فى نيويورك سيتى، التى عملت مع فيرنون وي Vernon Oi من مركز بيكتون-ديكسون الأحادى الاستنساخ فى مونتين فيو بكاليفورنيا، ومشارك

شولمان Marc Shulman ونوبوميشى هوزيومى Nobumichi Hozumi من جامعة تورنتو بكندا، ومايكل نيوبرجر Michael Neuberger من معمل MRC للبيولوجيا الجزيئية فى كمبردج بإنجلترا.

ولكى يتم إنشاء جسما مضادا مختلطا ،فإنه يجرى صنع جينات السلاسل الخفيفة والثقيلة بصورة مستقلة بواسطة طرق تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم. والتسلسلات الجينية المستسخة متوفرة بالفعل للمناطق الثابتة لنوعين من السلاسل الخفيفة البشرية ولخمس أنواع من السلاسل الثقيلة البشرية. وتستسخ التسلسلات الجينية المشفرة عن المناطق المتغيرة فى الفأر بواسطة سلسلة خلية ورم هجين تصنع جسما مضاد أحادى الاستساخ ذا تخصص مرغوب، ويتولد الورم الهجين نفسه بطريقة قياسية.

وتتحد بعد ذلك التسلسلات المستسخة لمناطق السلسلة الخفيفة الثابتة والمتغيرة مثل السلاسل الثقيلة لتكوين الجينات الكاملة. وبمجرد أن تتوفر الجينات للسلاسل الخفيفة والثقيلة المختلطة فيتم إدخالها سويا فى خلايا نخاع الورمى للفأر، حيث تصنع البروتينات وتتجمع جزيئات الجسم المضاد الكاملة. وعلى الرغم من أن نظام صنع الأجسام المضادة المختلطة يبدو نظاما مرهقا، فإن الخطوات الفردية تعتبر روتينية حاليا .

وتبعا لموريسون، فإن أنواع الأجسام المضادة التى يمكن صنعها محدودة فى المقام الأول من وجهة الباحث التخليقية. وبالإضافة إلى إنتاج الأجسام المضادة الكميرية البشرية-الفأرية، يستطيع الباحثون، على سبيل المثال، أن يصنعوا أجساما مضادا ذات تخصص ونوعية مرغوبة، تتحدد من تركيب منطقة الثابتة للسلسلة الثقيلة. وبالنسبة لإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستساخ، فلا يستطيع

الباحثون التحكم فى نوع الجسم المضاد الذى سينتجه ورم هجين، ويعتبر هذا مهماً، لأن الأنواع المختلفة لها وظائف مختلفة.

الأجسام المضادة لمضاد مثال التوالد

Anti-idiotypic antibodies

قد لا تكون المناطق الجسم المضاد المتغيرة بنفس الفاعلية كالمناطق الثابتة فى استخراج الاستجابات المناعية، فى حين لا تملأ المناطق المتغيرة تماماً من هذه المقدر، فجزئيات الجسم المضاد تحمل مناطق داخل أو بالقرب من مواقع التعرف على المستضدات التى يمكن أن تعمل على استجلاب إنتاج الجسم المضاد. وهذه المناطق- التى تسمى بمثاليات التولد بلغة علم المناعة- تعتبر صفة مميزة لكل جسم مضاد. والأجسام المضادة التى استخدمتها مجموعة ليفى لعلاج الورم اللمفى للخلية B، كانت فى الواقع موجهة ضد مثاليات مولد الأجسام المضادة على خلايا السرطان.

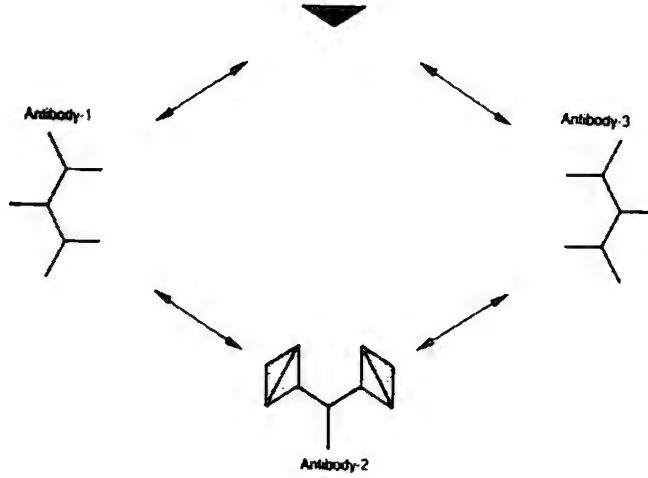
وإحدى الإسهامات التى نال عنها جيرن Jerne جائزة نوبل، نظريته "الشبكية" لتنظيم الجسم المضاد. فقد اقترح أن الجهاز المناعى يحتوى على شبكة متداخلة من الأجسام المضادة التى تكون موجهة نحو مثاليات المولد بعضها البعض. وفى ظل الظروف العادية، فإن تركيز كل جسم مضاد يرتفع بالأجسام المضادة لمثال تولده، أى بالأجسام المضادة لمضاد مثال التولد. ودخول مستضد يقلب هذا النظام رأساً على عقب، ويؤدى إلى إنتاج متزايد من الأجسام المضادة التى تتعرف على المستضد. ويؤدى هذا بالتالى إلى إنتاج متزايد من الأجسام المضادة لمضاد مثال التولد المناظر، وفى النهاية إلى نقصان إنتاج الأجسام

لمضادة الأولى. وعلاوة على ذلك، فإن الأجسام المضادة لمضادة لمثال لتولد، تحدث إنتاجا آخر من الأجسام المضادة التي تتعرف على مثاليات تولدها (مثاليات التولد المضادة للمضادة) وهلم جرا. وهكذا ينتشر الاضطراب خلال الشبكة بصورة تشبه انتشار الفقائيع فوق سطح بركة. ولا ندرى إن كانت ستعمل شبكة جبرن كما اقترح فى تنظيم إنتاج الجسم المضاد، فلا تزال مسألة خلافية ، لكنه ليس هناك شك فى وجود الأجسام المضادة لمضاد مثال التولد . وفى الآونة الأخيرة، تحول الباحثون إلى الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد كنوع جديد محتمل من اللقاح. ويقدم هذا المدخل وسيلة للتحصين ضد الكائن العضوى المسبب لمرض ما دون استخدام الكائن العضوى نفسه. ويمكن أن تكون هذه ميزة، إذا كان من الصعب زراعة الكائن الممرض أو يصعب التعامل معه، أو إذا كان حقن المادة الممرضة تسبب تأثيرات جانبية ضارة.

وللمستضد وجسمه المضاد شكلان متكاملان، فهما يتوافقان مع بعضهما مثل توافق المفتاح مع قفله، على الرغم من أنه ليست لجزيئات المستضد والجسم المضاد صلابة القفل والمفتاح. ويرتبط جسم مضاد مضاد لمثال التولد بنفس منطقة الجسم المضاد التي يرتبط بها المستضد المناظر . ويعنى هذا ضمنا أن للمستضد والجسم المضاد المضاد لمثال التولد أشكالا فراغية متماثلة. فإذا كانت الحالة كذلك، فيجب أن يؤدي حينئذ التحصين بالجسم المضاد المضاد لمثال التولد إلى إنتاج الأجسام المضادة التي يمكنها التعرف على كلا من الجسم المضاد المضاد لمثال التولد والمستضد (شكل ١٢-٩) وإن هذا قد يضيف مناعة وقائية ضد المستضد .

ولا تزال محاولات تطوير أجسام مضادة مضادة لمثال التولد كهذه فى بداية مراحلها، فى حين تشير بعض الدراسات إلى أن هذا المسار سينجح. وعلى سبيل المثال، قام رونالد كنيدي Ronald Kennedy وجوردون دريسمان Gordon Dreesman من المؤسسة الجنوبية الغربية للأبحاث الطبية الحيوية فى سان أنطونيو بولاية تكساس، بحقن الأرانب بالأجسام المضادة البشرية على سطح مستضد فيروس التهاب الكبد الوبائي B. وحفزت الأجسام المضادة البشرية على إنتاج الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد فى الأرانب، والتي تم تنقيتها بعد ذلك واستخدمت فى تحصين الشمبانزى، وهو الحيوان غير البشرى الوحيد الذى يصاب بالتهاب الكبد الوبائي B. وبالتالي فقد صنعت الحيوانات التى تحصنت أجساما مضادة لسطح مستضد التهاب الكبدى الوبائي B، وكانت محمية ضد المرض عندما هاجمها الفيروس. بالإضافة إلى ذلك، تقوم مجموعة كوبرويسكى بتطوير لقاح مضاد لمثال التولد للوقاية من فيروس داء الكلب rabies virus، ويجرى اختبار هذه الطريقة كوسيلة ممكنة لصنع لقاح ضد فيروس الأيدز الخطير.

وقد توفر الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد أيضا الحماية ضد السرطان. واكتشف انجيرد هيلستروم Ingegerd Hellstrom وكارل ايرك هيلستروم Karl Erik Hellstrom وزملاؤهما فى مدرسة الطب بجامعة واشنطن فى سياتل، أنهم يستطيعون استجلاب المناعة الموجودة فى الفئران لمستضد سرطان بشرى، عن طريق حقن الحيوانات بجسم مضاد مضاد لمثال التولد. واقترح كوبرويسكى أن استجلاب المناعة فى بعض مرضى السرطان الذين عالجتهم مجموعته بالجسم المضاد أحادى الاستتساخ المأخوذ من الفأر ربما يسهم فى انحسار أورامهم.



شكل ٩-١٢ شبكة مبسطة من مضاد مثال التولد. والجسم المضاد (antibody-١) الذي نتج استجابة لمستضد يمكن أن يستجلب بنفسه إنتاج الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد (antibody-٢). ويجب أن يشابه التركيب الفراغي لجزء الجسم المضاد المضاد لمثال التولد الذي يرتبط بالجسم المضاد الأول التركيب الفراغي للمستضد الأصلي. ونتيجة لذلك ، يجب أن يستجلب التحسين بالجسم المضاد المضاد لمثال التولد إنتاج الأجسام المضادة التي تتعرف على كلا من الجسم المضاد المضاد لمثال التولد و للمستضد .

مستقبل الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

The future of monoclonal antibodies

للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أكثر مما برهنت عليه فاعليتها في الأبحاث الأساسية، وبدأت تنتقل من المعمل إلى العيادة. وسوف تستمر التطبيقات التشخيصية في النمو بسرعة، وسوف تتطور من الاختبارات التي كانت تؤدي على الدم والمواد الأخرى التي كانت تسحب من الجسم إلى التصوير المباشر للورام السرطانية داخل المرضى. وسوف يكون تطور التطبيقات العلاجية أكثر ببطئا، في حين يؤكد الباحثون على أنهم يتعلمون الكثير عن كيفية استخدام

الأجسام المضادة أحادية الاستساخت في الناحية العلاجية في كل تجربة من تجاربهم الإكلينيكية .

وتتعلق إحدى طرق علاج السرطان التي لم تلق حتى الآن اهتماما كبيرا بما إذا كان يمكن استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستساخت في منع الخلايا السرطانية من تلقى بعض المنبهات البيوكيميائية الأساسية. وعلى سبيل المثال، إذا كان نمو الخلايا يعتمد على وجود عامل نمو أو على المنتج المنشط لمسرطن، فربما يحدث حينئذ أى جسم مضاد أحادى الاستساخت يوقف نشاط عامل النمو أو المنتج المسرطن انحصارا للورم.

وقد أوضحت مينا وزملاؤها أن هذه الاستراتيجية قد تنجح. وتنتج خلايا SCLC سرطانات الخلية الصغيرة الرئوية بروتين بومبسين bombesin، وهو بروتين يعمل كعامل نمو لهذا النوع من الأورام الخبيثة. وقد ولدت مجموعة مينا جسما مضاد أحادى الاستساخت لبروتين البومبسين bombesin وأوضحت أنه يمنع نمو أورام SCLC التي زراعتها في الفئران. ويخطط الباحثون لمحاولة أولية لجسما مضادا في المرضى. وتشكل المتقبلات التي يجب أن ترتبط بها عوامل نمو مثل البومبسين لكى تحدث تأثيراتها، تشكل هدفا ممكنا آخر للعلاج بالجسم المضاد أحادى الاستساخت.

وقد لوحظ بالفعل التزاوج بين تكنولوجيات الجسم المضاد أحادى الاستساخت والـ د.ن.أ. المطعم التي تمكن الباحثون من صنع الأجسام المضادة المختلطة والأنواع الأخرى من الأجسام المضادة المتغيرة بواسطة الهندسة الوراثية. ولا

العقاقير أو النظائر المشعة بالأجسام المضادة دون تغيير تخصص الأجسام المضادة أو نشاطها. وعندما تتوفر هذه المعلومات، فقد تتيح تكنولوجيا الأجسام المضادة الكميرية مواقع ربط ملائمة للعوامل العديدة التي ستشأ داخل جزيئات الأجسام المضادة.

وتتدمج تكنولوجيا الجسم المضاد أحادي الاستنساخ مع التكنولوجيا التي تقوم بإنتاج الأجسام المضادة الموجهة الموقع (أنظر الفصل الرابع عشر). وتستجلب ببتيدات قصيرة إنتاج أجساما مضادة تتعرف وترتبط بنفس التسلسل الببتيدى عندما تحمل داخل بروتينات سليمة. وسوف يسمح هذا للباحثين بأن يختاروا مقدما الموقع البروتينى الذى سيتفاعل مع الجسم المضاد، وهى إمكانية مفيدة عندما يكون الهدف هو التدخل فى بعض الوظائف التخصصية لبروتين مثل النشاط الحفزى لإنزيم أو ربط فيروسا بهدفه. وقد كانت الأجسام المضادة الموجهة الموقع تصنع فى الماضى بطرق تقليدية، غير أن الباحثين بدأوا فى التحول إلى إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ موجهة الموقع، فى محاولة توضيح أخرى لتعددية استخدام تكنولوجيا الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

الفصل الثالث عشر

الأجسام المضادة الموجهة الموقع في

البيولوجيا والطب

Site-directed antibodies in

biology and medicine

لا توفر طريقة جديدة وقوية لصنع أجسام مضادة أدوا بحثية مهمة للباحث في علم المناعة، والباحث في علم البيولوجيا الجزيئية، وكيميائي البروتينات فقط، لكنها تحمل أيضاً آمالاً عريضة لتطبيقات طبية، مثل التشخيص والوقاية من الأمراض، وتعد الطريقة الجديدة ثمرة ملاحظة دامت بضع سنوات مضت بأن الأجسام المضادة التي سوف تتفاعل مع أى موقع تقريباً في البروتين يمكن أن يستثيرها ببتيد قصير منظر لذلك الموقع، ومنذ ذلك الحين، فقد نتجت عن أبحاث الأجسام المضادة رؤية جديدة عن الكيمياء المناعية وتركيب البروتينات في محاليلها، بالإضافة إلى ذلك، لا تزال الجهود مستمرة لاستخدام التكنولوجيا المنتجة للجسم المضاد في صنع لقاحات آمنة ومحددة كيميائياً، وكواشف جديدة متخصصة لاختبارات التشخيص.

واكتشاف أن الببتيدات ^(١) عموماً يمكن أن تثير الأجسام المضادة التي تتفاعل مع البروتينات كان له وقع المفاجأة التي أثارت المجتمع المناعي فى أوائل

^١الببتيد هو مركب يحتوى على حمضين أمينيين أو أكثر، وتكون فيه مجموعة الكربوكسيل فى أحد الأحماض الأمينية مرتبطة بمجموعة الأمينو فى الحمض الآخر. (المترجم)

الثمانينات، فقد أوضح ف. أندريز F.Anderer من معهد ماكس بلانك منذ عشرين سنة، أن ببتيذاً قصيراً يماثل الأحماض الأمينية الستة الأولى للغطاء البروتيني لفيروس فسيفساء الطباقي، يثير الأجسام المضادة التي ترتبط بالبروتين السليم، وعلى الرغم من ذلك، فقد كانت وجهة النظر السائدة في ذلك الوقت، إن ذلك لم يكن ظاهرة واسعة الانتشار، وأن معظم الببتيدات لن تكون قادرة على إثارة الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين.

و غالباً ما كانت وجهة النظر هذه نتيجة اعتبارين. الاعتبار الأول: إن الأجسام المضادة التي يثيرها بروتين سليم لا تتفاعل إلا مع بضعة مراكز صغيرة على سطح البروتين، وعلى سبيل المثال، فقد ظهر أن أقل من ٢٥% من الأحماض الأمينية لبروتينات الليزوزوم lysozyme والميوجلوبين myoglobin المتميزة تماماً، مرتبطة بشكل مباشر في تفاعلات مع الأجسام المضادة، وينطوي هذا الاكتشاف على أنه بدون معرفة سابقة بمراكز ارتباط الجسم مضاد لبروتين، فإن الاختيار العشوائي لببتيد يحتوي على مركز كهذا يكون بعيد الاحتمال.

ثانياً: تعتمد قدرة أي جسم مضاد على الارتباط ببروتين بصورة حاسمة على التركيب الثلاثي الأبعاد (الشكل التركيبي) للبروتين، فالأجسام المضادة التي يستثيرها تركيب طبيعي تتفاعل بصورة ضعيفة، إن لم تكن على الإطلاق، مع بروتين تغير شكله بمعالجات مغيرة للطبيعة، وتقترح هذه النتائج أنه للحصول على أجسام مضادة متفاعلة مع البروتين، فإن العامل المُحصن immunizing agent يجب ألا يكون له فقط نفس تسلسل الحمض الأميني مثل البروتين بل يجب أن يكون له نفس الشكل التركيبي، وتعتبر الببتيدات الموجودة في محاليلها

أكثر مرونة، ويمكنها أن تتخذ أشكالاً عديدة أكثر من البروتينات، ودلت هذه الاعتبارات بشكل قاطع للعديد، على أن استخدام الببتيدات في إنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتينات، لا يكون مجدياً إلا في حالات خاصة، ولا يمكن أن تشكل الأساس لتكنولوجيا عامة.

ومع ذلك، فقد نشأت الاعتبارات أساساً من دراسة الأجسام المضادة التي نتجت استجابة للبروتينات السليمة، فتخصصات الأجسام المضادة التي أثارها الببتيدات، يمكن أن تختلف تماماً عن التخصصات التي صنعت لبروتينات سليمة، وتصنع الأجسام المضادة التي تولدها البروتينات لإحدى صور الجزيئات الأكثر تقييداً في الشكل، في حين تصنع الأجسام المضادة التي يثيرها الببتيد بصورة أقل تقييداً-ويحتمل أن تكون عشوائية-من صور الجزيء، وبمعنى آخر، لا يمكننا أن نستنتج أن الأجسام المضادة التي أثارها ببتيد لا تكون قادرة على الارتباط ببروتين سليم، لمجرد أن الأجسام المضادة التي ولدها البروتين فشلت في الارتباط بالببتيد، فتولد المناعة Immunogenicity لا تساوى التولد المضاد antigenicity عندما نأخذ في الاعتبار نوعي الجزيئات.

يعنى تولد المناعة، قدرة أى مادة على إثارة أجسام مضادة لترتبط بها، بينما يعنى التولد المضاد قدرة أى مادة لأن يتعرف عليها ويرتبط بها مستحضر جسم مضاد معين، وغالباً ما ظهر بعض الالتباس حول هذين المصطلحين، ويحتمل أن يكون السبب في ذلك هو أن الأجسام المضادة تتولد بصورة نموذجية من المادة نفسها التي تتفاعل معها، وفي هذه الحالة، فإن مركز مولد المناعة يماثل بصورة مباشرة مركز تولد مضاد. ومع ذلك، فالأجسام المضادة التي تثيرها

إحدى المواد، غالباً ما لا ترتبط فقط بهذه المادة ولكنها ترتبط أيضاً بمادة أخرى، على الرغم من أن العكس ليس صحيحاً. فالأجسام المضادة التي تثيرها مادة ثانية ترتبط بها فقط ولا ترتبط بالمادة الأولى، وعلى سبيل المثال، فالأجسام المضادة التي تثيرها بكتيريا المكورة الرئوية *pneumococcal bacteria* ، يمكن أن ترتبط بالبكتيريا وبطبقة عديد السكريات المنقى من البكتيريا، في حين لا تتفاعل الأجسام المضادة التي تولدت من الطبقة المنتقاة مع البكتيريا السليمة، وبالنسبة للأجسام المضادة التي ترتبط بالبكتيريا، تكون بناء على ذلك طبقة عديد السكريات المنقى مستضادة وليست مولدة مناعة.

مناعة البروتينات

Immunology of proteins

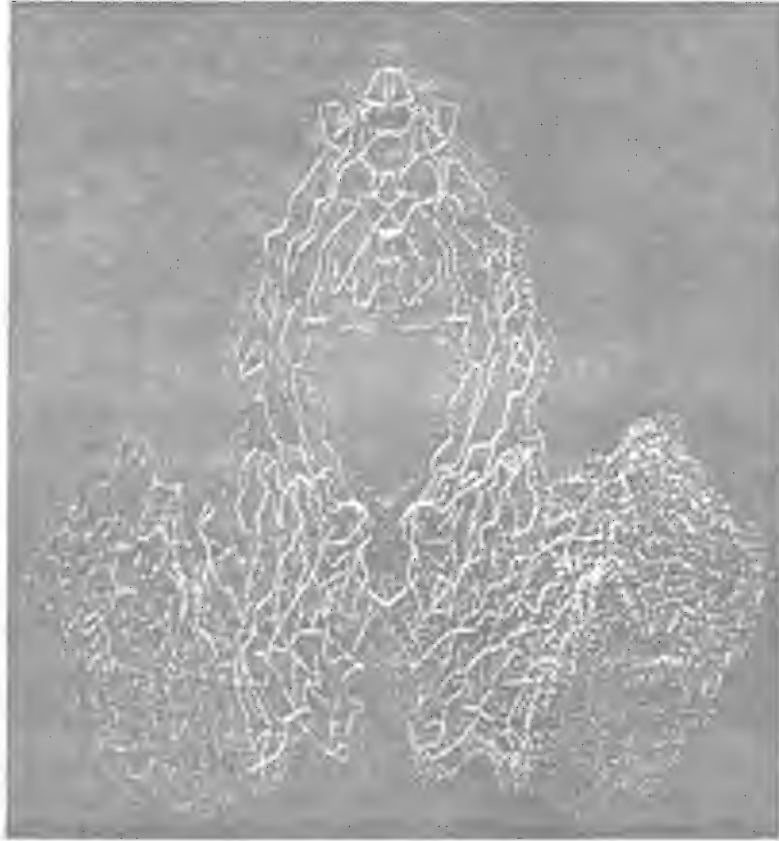
لقد بذل جهد كبير طوال عدة عقود ماضية لتحديد تولد مناعة البروتينات وتولدها المضاد ، وكانت الطريقة النموذجية إثارة الأجسام المضادة بواسطة البروتين الطبيعي وبعد ذلك تقطيع البروتين بواسطة بوسائل كيميائية أو إنزيمية عديدة ، وتحديد أى القطع التي تحتفظ بالقدرة على التفاعل مع الأجسام المضادة، وأبرزت هذه الدراسات صورة محددة المعالم للمواقع المستضدية التي تتعرف عليها الأجسام المضادة التي ولّتها البروتينات السليمة، وتعتبر هذه المراكز صغيرة- ما بين أربع إلى سبع فضلات أحماض أمينية، تتفاعل بصورة مباشرة مع الجسم المضاد- وقليلة العدد (أشكال ١٣-١٣ و ١٣-١٣ و ١٣-٣)، وعلاوة على ذلك، فارتباط الجسم المضاد يعتمد بصورة دقيقة على شكل مستضد البروتين.

ولعبت الدراسات التى أجريت على التركيب المستضدى لإنزيم الليزوزيم الذى يستمد من بياض بيض الدجاج دوراً تجريبياً رئيساً فى تطور مفاهيم استضاد البروتينات وتولد مناعتها التى سادت فى أواخر السبعينات ، وكان يستخدم الليزوزيم كنموذج للبروتينات الكروية، لأنه مولد مناعة عال وصغير، إذ يحتوى على ١٢٩ فضلة حمض أمينى فقط فى سلسلة عديد الببتيد الواحدة، وعلاوة على ذلك، فقد تم تحديد التركيب الثلاثى الأبعاد للبروتين بطرق الكشف عن البلورات بالأشعة السينية.

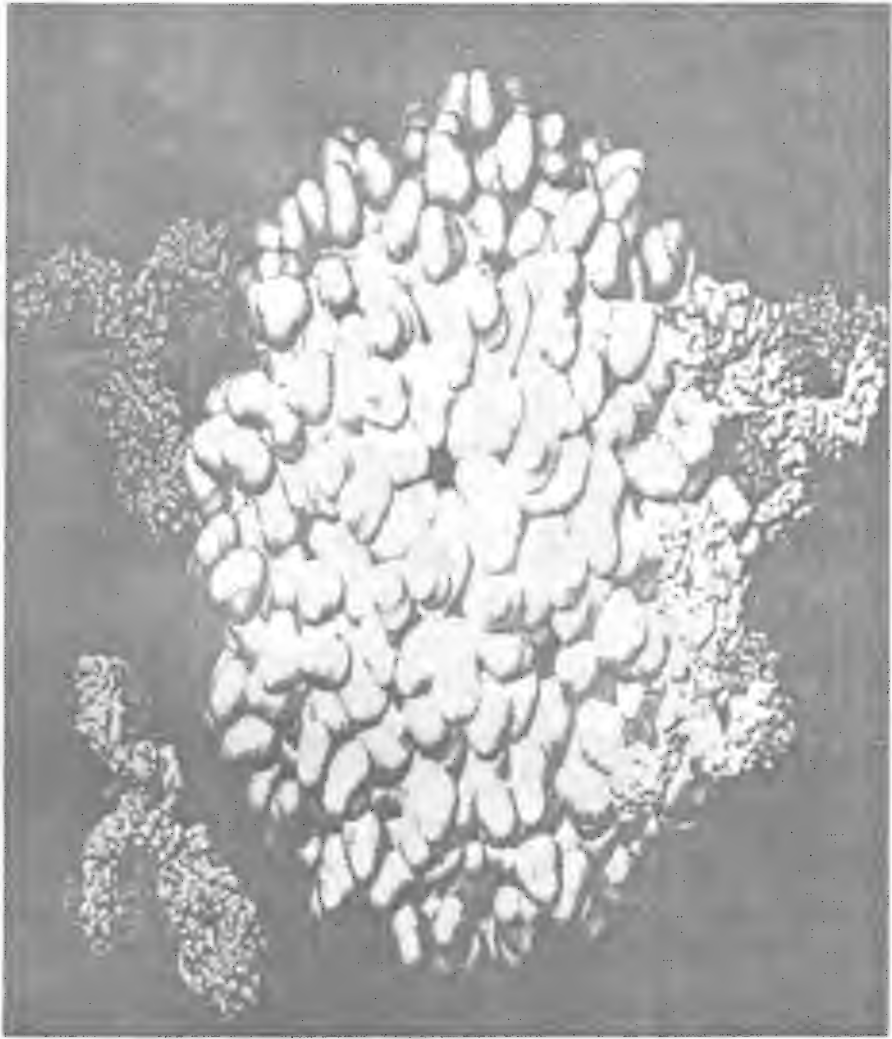
وكان يتم الحصول على الأجسام المضادة فى معظم دراسات الليزوزيم بتحسين ماعز أو أرنب ببروتين سليم مشكل بصورة نموذجية طبيعية، وبذلك كانت الدراسات تحدد المراكز الاستضادية التى تعرفت عليها الأجسام المضادة التى أثارها الليزوزيم الطبيعى.

ولعبت أربع روابط ثنائى كبريتيد دوراً مهماً فى كبح الليزوزيم فى تركيبه الطبيعى الثلاثى الأبعاد ، وجاءت الدلالة الأولى على أن ارتباط الأجسام المضادة بالمراكز المستضادية المناظرة يعتمد بدرجة كبيرة على التركيب الشكلى لهذه المواقع من خلال التجارب التى جعل فيها جزيء الليزوزيم ينفرد (بعد أن كان مطويا) بمعالجته بعوامل مغيرة لحالته الطبيعية، وبعد ذلك تمزيق روابط ثنائى الكبريتيد بعوامل مختزلة، وأبطلت هذه المعالجة بشكل كامل تقريباً قدرة الأجسام المضادة التى تولدت فى الأصل من البروتين الطبيعى على الارتباط بالجزيء، وبطريقة عكسية، ارتبطت الأجسام المضادة التى أثارها البروتين التى تغيرت طبيعته بسهولة بالجزيء الذى تغيرت طبيعته، ولكن

بطريقة ضعيفة أو لم ترتبط على الإطلاق بالليزوزيم المشكل بطريقة طبيعية، وأوضحت هذه النتائج أن الأجسام المضادة، لا تقرأ تسلسلات الأحماض الأمينية بطريقة بسيطة، ولكن يجب أن نتعرف وترتبط بشيء ما خاص بشكل البروتين المستهدف.



شكل ١٣ - ١ تمثيل تخطيطي بواسطة الكمبيوتر لتركيب جزيء الجسم المضاد، جزيء الجسم المضاد هو بروتين يتخذ شكل حرف Y، الذي يتكون من أربع سلاسل بروتينية، وتمتد السلسلتان البروتينتان الثقيلتان (المطوحتان الأزرق) من الجذع Y إلى الأفرع. وتنحصر السلسلتان البروتينتان الخفيفتان (المطوحتان الخضراء) في الأفرع، ولكل سلسلة من السلاسل الأربع منطقة ثابتة (الهيكل الصفراء والبيضاء) ومنطقة متغيرة (الهيكل الأحمر)، وتشكل المناطق المتغيرة المشتركة من السلاسل السلاسل الثقيلة والخفيفة مناطق تعرف بمستند الجسم المضاد.



شكل ١٣ - ٢ نموذج تخطيطي بالكمبيوتر لأربع جزيئات من الجسم المضاد تتفاعل مع جزيء فيروسى افتراضى (يظهر باللون الذهبى)، وتظهر السلاسل الثقيلة للجسم المضاد باللون الأزرق والسلاسل الخفيفة باللون الأحمر المزرق، ويبين النموذج الأطوال النسبية للأجسام المضادة وهدفاً فيروسياً نموذجياً، ولا يلمس كل جزيء من الجسم المضاد إلا جزء صغيراً من السطح الفيروسي، وتتفقد تفاعلات الأجسام المضادة أيضاً بالبروتينات الفيروسية بقطع صغيرة من هذه البروتينات.



شكل ١٣ - ٣ نموذج تخطيطي للكمبيوتر لفيروس التهاب منجارية النخاع polyvirus، وتحدد الألوان الزرقاء والصفراء والبرتقالي، البروتينات المختلفة على سطح الفيروس، وتدل المناطق البيضاء على قطع ارتباط الجسم المضاد في البروتينات الفيروسية، والتي لا تشكل مرة أخرى إلا جزء صغيراً من هذه البروتينات.

ولمعرفة المواقع المستضادية لليزوزيم وتحديدتها والتي ترتبط بالأجسام المضادة التي أثارها الإنزيم الطبيعي، قام م. أتاسي M. Atassi من كلية طب بايلور في هيوستون بولاية تكساس وزملاؤه المشاركون بقطع الإنزيم وقاسوا ارتباط الأجسام المضادة بالقطع العديدة، وقد استطاعوا بهذه الطريقة تحديد ثلاثة مراكز مستضادة ارتبطت بأكثر من ٩٠% من الأجسام المضادة، ويشمل المركز الأول فضلات الأحماض الأمينية من ٥ إلى ١٤ ومن ١٢٥ إلى ١٢٨، والتي تجمعت مع بعضها على سطح الإنزيم بواسطة رابطة ثنائي كبريتيد بين أحماض السستينات ٦ و ١٢٧، ويحتوي المركز الثاني على فضلات من ٦٠ إلى ٨٠ ومن ٨٧ إلى ٩٠، والتي تلتصق بجوار بعضها بواسطة روابط ثنائي الكبريتيد بين السستينات ٦٤ و ٨٠ وبين السستينات ٧٦ و ٩٤، واشتمل المركز الثالث فضلات من ١١٣ إلى ١١٦ و ٣٠ إلى ٣٤، والتي ارتبطت ببعضها برابطة ثنائي كبريتيد بين فضلات السستينات ٣٠ و ١١٥.

ولإيجاد أى فضلات خاصة داخل المراكز الثلاثة تتفاعل بشكل مباشر مع الأجسام المضادة، قام أتاسي وزملاؤه بتخليق ببتيديات قصيرة كيميائياً لكي يستسخوا الأشكال التركيبية للأحماض الأمينية فى هذه المواقع ، وقد افترضوا أن الأجسام المضادة فى محاليلها لن تتفاعل إلا مع فضلات الأحماض الأمينية على سطح البروتين المستهدف، وبواسطة التركيب البلورى بأشعة أكس لليزوزيم، استطاع الباحثون تحديد أى فضلات المراكز المستضدية الثلاثة لليزوزيم كانت مكشوفة على السطح، ولذلك كانت تختارها الفضلات، وباستخدام الحمض الأميني جليسين "كمباعد"، قاموا بعد ذلك بتخليق الببتيديات التى كانت تثبت فيها الأحماض الأمينية فى المواضع الصحيحة بالنسبة لبعضها البعض.

وبتحليل قدرة سلسلة من هذه الببتيدات "المحفزة السطح" على الارتباط بالأجسام المضادة الذى أثارها الليزوزيم الطبيعى، ظهر أن الفضلات المطلوبة لربط الجسم المضاد بالمركز ١هى: الأحماض الأمينية الأرجينينات ٥ و ١٤ و ٢٥ و حمض الجلوماتيك ٧ والليسين ١٣؛ وكانت الفضلات المطلوبة فى المركز ٢هى: الحمض الأميني التربتوفان ٦٢ والليسين ٩٦ و ٩٧ والأسباراجين ٩٣ والثريونين ٨٩ وحمض الأسباراتيك ٨٧؛ وفى المركز الثالث: الليسينات ٣٣ و ١٦ والأسباراجين ١٣ والأرجينين ١١٤ والفنيل الألانين ٣٤، وصمم أتاسى وزملاؤه هذه الأحماض الأمينية الستة عشر، لأنها تعتبر الفضلات "المهمة" لربط الجسم المضاد، ومع ذلك، فإن الفضلات التى تأمر ببطى جزيء البروتين، على الرغم من أنها لا تتصل اتصالاً مباشراً بجزيء الجسم المضاد المرتبط، فإنها تعتبر أيضاً مهمة، بمعنى أنها ضرورية من أجل الاحتفاظ بشكل البروتين الصحيح. وتشكل كل من المجموعات الثلاث من الأحماض الأمينية الأساسية جزءاً فراغياً مستمراً من البروتين، على الرغم من تباعد الأحماض الأمينية الفردية عن بعضها البعض فى التسلسل الطولى لليزوزيم، وعلى فرض أن الفضلات الأساسية تكون فى أوضاعها الصحيحة بحيث لا تتفاعل بطريقة صحيحة مع الأجسام المضادة إلا فى البروتين المطوى، فليس من المثير للدهشة أن تغيير الطبيعة يلغى أساساً ارتباط الجسم المضاد بجزيء الليزوزيم.

والتجارب التى أجريت فى أواخر الستينات وأوائل السبعينات فى معامل ميشيل سيلا ورث أرنون، وكلاهما من معهد وايزمان فى Rehovot بإسرائيل وكريستيان أفينسين من المعاهد القومية للصحة فى بتسدا بولاية مرييلاند، اقترحت

أيضاً أن محددات المستضدية والمناعية للبروتين هي محددات تعتمد على الشكل التركيبى، وتشكل الفضلات من ٦٤ إلى ٨٠ للليزوزيم تركيباً حلقياً على سطح البروتين المتماस्क بواسطة رابطة ثنائى الكبريتيد بين السسيتينات ٦٤ و٨٠، ويمكن الحصول على هذه الحلقة، إما بواسطة الانقسام من البروتين، أو بواسطة التخليق الكيمى، وقد استخدمها سيلا وأرنون وأنفينسين وزملاؤهم فى اختبار ما إذا كان يؤدى فتح الحلقة إلى تغير مناعيتها واستضاديتها.

وتفاعلت الأجسام المضادة المستثارة للليزوزيم الطبيعى أو للحلقة المغلقة بقوة مع البروتين السليم والحلقة المغلقة، فى حين تفاعلت بصورة ضعيفة أو لم تتفاعل على الإطلاق مع الحلقة المفتوحة، وفى المقابل، لم يمكن للأجسام المضادة التى صنعت للحلقة المفتوحة أن تتفاعل إلا مع حلقة مفتوحة، وأظهرت التجارب مرة أخرى أن الأجسام المضادة تتفاعل مع مستضدات فريدة فى الشكل، والأكثر من هذا، اقترحت الدراسات، أن من الضرورى إنتاج تركيبات معقدة لإنتاج مستضدات تخليقية يمكن أن ترتبط مع الأجسام المضادة التى تستثيرها بروتينات سليمة.

مهمة كهذه ستكون صعبة فى أحسن الأحوال، ولا تكون مفيدة إلا عندما يتحدد التركيب الثلاثى الأبعاد الكامل للبروتين، وهناك نتيجتان عامتان بالنسبة لمحددات المستضدية، ألا وهما أنها قليلة العدد نسبياً وغير متصلة، وتعتمد إلى حد بعيد على الشكل التركيبى، لم تنتظر طويلا الجهود الموجهة نحو تحسين تكنولوجيا عامة لتوليد الأجسام المضادة لأى موقع بروتينى.

على أنه فى الآونة الأخيرة، انتقدت فكرة وجود مراكز قليلة تحدد الاستضادية الكلية لبروتين ما انتقاداً شديداً، فقد أظهرت دراسات الليزوزيمات

التي تحمل بدائل الحمض الأميني لمواقع خارج المراكز الاستضادية التي تعرفت عليها مجموعة أتاسي ، على سبيل المثال، أن الليزوزيمات المختلفة يمكن تمييزها بتفاعل جسمها المضاد، وتوضح هذه النتيجة أنه يوجد الكثير من المراكز الاستضادية عما كان يعتقد من قبل، وأنه لا يزال من الممكن بطبيعة الحال أن يتغير مركز من مراكز المحددات الأصلية بتغير حمض أميني في موضع آخر.

وقد أعطت الدراسات التي قامت بها سندرا سميث-جيل وزملاؤها في المعاهد القومية للصحة دعماً إضافياً للاقتراح بأن هناك مراكز مستضادية أخرى على الليزوزيم، وعندما صنع هؤلاء الباحثون جسماً مضاداً أحادي الاستساخ (انظر الفصل الثاني عشر) لليزوزيم دجاجة، وجدوا أنه يتفاعل بشكل كامل مع ليزوزيمات سبعة أنواع مختلفة من طيور الدجاجيات galliform، وجزئياً مع نوعين آخرين من أنواع galliform، ولم يتفاعل على الإطلاق مع ليزوزيم البط.

وبمقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات، حددت مجموعة سميث-جيل أن مركز ربط الجسم المضاد المحتمل، يشتمل الأرجينين ٤٥ والأرجينين ٦٨ ويمتد إلى الشق بين أرجينين ٤٥ وأرجينين ١١٤، ويوجد هذا المركز خارج المراكز التي حددتها مجموعة أتاسي.

وقد يكون غير واقعي افتراض أن تولد المناعة وتولد المضاد الكاملة لبروتين ما، يمكن أن تتحدد بواسطة مستحضر واحد من الجسم المضاد، إن ما يعتبر

مستضاداً قد يعتمد كثيراً على نظام تمثيل المستضد والأنواع المحصنة كما يعتمد على تركيب مستضد البروتين.

مولدات المناعة الببتيدية التخليقية

Synthetic peptide immunogens

فى عام ١٩٨٠، بدأت تظهر دلائل أخرى تعارض اتجاه التفكير الذى رأى عدم احتمال أن تثير ببتيدات صغيرة نسبياً أجسام مضادة يمكنها التفاعل مع بروتينات سليمة تحتوى على تلك التسلسلات الببتيدية، فعندما أكمل ريتشارد ليرنر Richard Lerner وزملاؤه فى معهد أبحاث سكبرس كلينيك فى لا جولا بكاليفورنيا تحديد التسلسل النكليوتيدى لفيروس مولونى سرطان الدم الفأرى Moloney leukaemia، صادفهم موقع "غامض" كان يقع فى نهاية الطرف الأيمن من جين env الفيروسي، الذى يشفر عن بروتينات الغلاف الفيروسي، وكان للموقع المعنى إمكانية التشفير عن بروتين، فى حين لم يظهر البروتين المتنبأ عنه أنه يماثل أى من البروتينات الفيروسية المعروفة.

ولتحليل هذه القطعة من موقع تشفير env، قام باحثو سكبرس بتخليق ببتيـد بطريقة كيميائية يناظر النهاية الكربوكسيلية للبروتين المتنبأ عنه، وقاموا بصنع أجساما مضادة للببتيد واستخدموها فى البحث عن البروتينات الفيروسية التى تحتوى على التسلسل، وتفاعلت الأجسام المضادة معها ورسبت بروتينين فيروسيين من الخلايا المصابة، وكان أحدهما البروتين الكبير، الذى يعتبر البشير الذى قطعت منه البروتينات الغلافية. وظهر أن الثانى بروتين صغير يحتوى كلاً

من البروتين الغلافي (المسمى بـ $p15E$)، والتسلسل الذى شفر فى الموقع الغامض لمجموعة العوامل الوراثية الفيروسية.

وكما اتضح، فلم يناظر البروتين الغامض أى من البروتينات الفيروسية المعروفة، لأنه انفصل من البروتين $p15E$ عندما بدأ فيروس سرطان الدم يتبرعم من الخلايا، ومع ذلك، فإن البشير الذى يحتوى على $p15E$ والبروتينات الغامضة يمكن أن تكشف عنه الأجسام المضادة، ومن ثم تحل مشكلتين فى نفس الوقت: منتج موقع محتمل يشفر عن البروتين فى مجموعة العوامل الوراثية الفيروسية قد يحدد، ويتعقب مصير أثر جزء صغير من البروتين بصورة محددة أثناء نضج الفيروس. وفى نفس الفترة تقريباً، قام باحثون من معمل راسل دوليتل Russell Doolittle بجامعة كاليفورنيا فى سان دييجو بصنع أجسام مضادة لتخليق ببتيدات مناظرة لمواقع النهايات الكاربوكسية والأمينية لمستضد ورم كبير لفيروس القراي ٤٠، وأوضحوا أن الأجسام المضادة تفاعلت بصورة محددة مع البروتين السليم، وجمع هاتين الدراستين معاً، استطاعا أن تحييا إمكانية استخدام مولدات المناعة الببتيدية فى إنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين، بيد أنه كانت هناك معضلة فكرية لا تزال فى حاجة للتغلب عليها.

فى كلتا الدراستين اللتين ذكرتا من قبل، صنعت أجساماً مضادة من ببتيدات مناظرة لنهايات البروتينات، والى غالباً ما تختل وربما يكون محاكاتها بالببتيدات القصيرة أكثر سهولة. وإذا عدنا إلى دراسات أندريز فى عام ١٩٦٣، فقد كان هناك بعض النجاح فى استخدام نهايات البروتينات كمولدات مناعة، غير أنه لم تحدث محاولات كبيرة للتقدم أكثر من هذا، ونتيجة لذلك، كان لا يزال هناك بعض اليقين فى أن هناك ببتيدات بخلاف قطع النهاية يمكن استخدامها فى إنتاج

أجسام مضادة للبروتينات، وإذا كانت التكنولوجيا قاصرة على استخدام قطع النهاية، فمن المؤكد أن مولدات المناعة الببتيدية لن تكون طريقة عامة للحث على تكون كواشف مستمنعة متخصصة المركز لدراسة البروتينات.

ويتطلب البحث الكامل عما إذا كانت الببتيدات المناظرة لتسلسلات في البروتينات يمكنها أن تثير بصفة عامة أجسام مضادة تتفاعل مع البروتينات السليمة، بروتين يتفق مع معايير صارمة معينة، فيجب أن يكون تسلسل حمضه الأميني وتركيبه الثلاثي الأبعاد معروفاً ، ويجب أن تحدد مراكزه المستضادة والمستمنعة على تركيب الجزيء، وفي بروتين haemagglutinin الهيماجلوتين فييروس الإنفلونزا، الذي يقع على سطح الجسيم الفيروسي بكل هذه المعايير.

يحتوي بروتين الهيماجلوتين على اثنين من عديدات الببتيد المختلفة، اللذين يسميان HA¹ و HA². وأثناء فترة استجابة مناعية لدوى طبيعية بفيروس الإنفلونزا أو لهيماجلوتين منقى، تصنع أجساماً مضادة ترتبط أساساً بأربعة مواقع مستضدية فقط، تبعاً لدونالد ويلي وزملاؤه في جامعة هارفارد، الذين قاموا بعمل خريطة لأماكن المراكز التي كانت جميعها على HA¹. واستطاعت نيكولا جرين Nicola Green وزملاؤها في معمل لرنر أن تخلق عشرين ببتيداً مختلفاً، تمثل مجتمعة حوالي ٧٥% من التسلسل الأولى لـ HA¹، ولم يقم الباحثون بأية محاولة لمحاكاة التركيب الثلاثي الأبعاد الذي أظهرته المواقع المناظرة للبروتين، وعلاوة على ذلك، تماثل الببتيدات الفردية المواقع التي تظهر تركيبات ثانوية متنوعة: حلزونات ألفا alpha-helices و beta-pleated sheats وحلقيات

loops وأشكال ممتدة، وكانت الببتيدات مرتبطة ببروتينات حاملة وحقنت في الأرناب لإثارة أجسام مضادة.

ومن العشرين ببتيّداً، أثار ثمانية عشر منها أجساماً مضادة تفاعلت مع جزيء هيماجلوتين كامل أو مع فيروس سليم، وكانت النتيجة الرئيسة هي أن الثمانية عشر ببتيّداً، لم تكن بالضبط من المراكز المستضادية الأربعة التي حددتها مجموعة ويلي، لكنها كانت من أماكن متفرقة من كل تسلسل الحمض الأميني HA1. والمطلب الوحيد لكي يولد ببتيّد أجساماً مضادة متفاعلة مع البروتين، هو أن الببتيّد يجب أن يمثل موقع على سطح البروتين، وتدل نتائج التجربة على أن المعلومات المحمولة داخل ببتيّد طولي قصير نسبياً تكفي للحث على تفاعلية ضد جزيء بروتيني أكثر ضخامة ذي تركيب ثلاثي أبعاد معقد، وتقدّر أنه يمكن استخدام مولدات المناعة الببتيديّة المخلفة كيميائياً في توليد أجسام مضادة تتفاعل مع معظم مواقع البروتين.

وتوضح الدراسة أيضاً أن تولد المناعة لبروتين سليم هي أقل من مجموع تولد مناعة أجزائه ، وبمعنى آخر، توجد مناطق من بروتين لا تكون مستمنعة عندما تظهر أمام الجهاز المناعي كجزء من البروتين السليم، لكنها تكون مستمنعة عندما تمثل كببتيدات، وأحد التفسيرات المحتملة لهذا الاختلاف، هو أن مواقع البروتينات غير المستمنعة ظاهرياً تستطيع استثارة إنتاج الجسم المضاد، غير أن هذه الأجسام المضادة لا يكشف عنها اختبار التحديد، الذي يستخدم عادة لتحديد المراكز المستضدية، وفي هذه الحالة، سيكون لمجموعة الأجسام المضادة الكلية

لبروتين مثل هيماجلوتين الإنفلونزا، نمطاً تفاعلياً أوسع مما يلاحظ في دراسات التحديد.

ومع ذلك، فربما لا تنطبق هذه الحالة على الهيماجلوتينين، لأن مستحضرات الجسم المضاد الفعالة التي تم تحضيرها من بروتين الهيماجلوتينين السليم أو بواسطة فيروس، لا تتفاعل تبادلياً مع أى من هذه الببتيدات التخليقية، وعلى الأصح، يبدو أن معظم الاستجابة المناعية للهيماجلوتينين الطبيعي موجهة ضد المحددات التي لا تحاكيها الببتيدات القصيرة، ويتوافق هذا الاكتشاف مع مجموعة المعلومات التي توضح أن المحددات المستضدية على البروتينات السليمة تتشكل إلى بعيد في الطبيعة، وإن مثل هذه المحددات نادراً ما تحاكيها ببتيدات قصيرة

وقد أثار التكرار الشديد الذي تستطيع من خلاله الببتيدات استثارة إنتاج أجسام مضادة تتفاعل مع بروتينات سليمة مطوية سؤلاً عن كيف يمكن لببتيد مضطرب نسبياً توليد أجسام مضادة تتفاعل مع بروتينات على درجة كبيرة من الانتظام ، وقدم نمونجين لشرح هذه الفكرة . يثير أولهما مسألة تخمينية ، والفكرة هنا، هي أنه يمكن لببتيد في محلول أن يتخذ أشكالاً متنوعة، يحاكي البعض منها التركيبات الشكلية الموجودة في البروتينات الطبيعية، وأن الأجسام المضادة المصنوعة لهذا الجزء الصغير من الأشكال الببتيدية، هي فقط التركيبات الشكلية الوحيدة التي تتفاعل مع البروتين المطوى. حينئذ ، فنجاح التكنولوجيا قد يكون دليلاً على حساسية الاختبارات المناعية التي تستطيع الكشف عن نسبة صغيرة من الأجسام المضادة في خليط أكثر من مجرد شيء أكثر إثارة للاهتمام أصلاً . ومع ذلك، يمكن أن تتخذ الببتيدات في محاليلها آلاف أو حتى

مئات الآلاف من التركيبات الشكلية ،وكما يحكم عليها من خلال وسائل مطيافية فلا يوجد تركيب شكلى واحد يفضل عن الأشكال الأخرى، وبالفرض حينئذ أن التركيبات الشكلية التى تثير أجساماً مضادة فى حيوان معين تختار عشوائياً ،وأن حيواناً معيناً لا يعبر إلا عن جزء صغير من مخزون الأجسام المضادة التى يمكنها أن تتفاعل مع مستضد ،فقد يتوقع قدر كبير من التغير فى الأجسام المضادة التى يستثيرها ببثيد من حيوان لحيوان ، غير أن الحالة ليست كذلك ، فعندما تحصن حيوانات مختلفة بنفس الببتيد، فإنها تميل لأن تنتج نفس مقادير الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين.

ولاختبار النموذج التخمينى بطريقة شكلية، استخدم هنرى نيمان Henry Niman من مجموعة ليرنر Lerner group أجساماً مضادة أحادية الاستساخ، كأسلوب لتقدير التكرار الذى تستجلب من خلاله الببتيدات أجساماً مضادة تتفاعل مع البروتين الطبيعى، وقد صنع أجساماً مضادة أحادية الاستساخ لكل ببثيد من الببتيدات الستة من البروتينيات الثلاثة المختلفة، واختبر بعد ذلك قدرة الأجسام المضادة على الارتباط بالبروتين السليم المناسب، وكان سبعة عشر جسماً مضاداً من الواحد وعشرين جسماً مضاداً، التى أثارها ببثيد واحد من بروتين الإنفلونزا الهيماجلوتينين قادرة على التفاعل مع جزيء الهيماجلوتينين السليم، وهو تكرار يزيد ١٠٠٠٠ مرة على الأقل مما كان يتوقع من النموذج التخمينى، وتم الحصول على نتائج مشابهة من خمسة ببثيدات أخرى.

التولد المضاد وحرية تحرك قطع البروتين

Antigenicity and the mobility of protein segments

إذا كان النموذج التخميني غير صحيح، فقد تتفاعل الأجسام المضادة حينئذ مع التركيبات الشكلية البروتينية التي تختلف عن البروتينات التي شوهدت أساساً مجمدة في التركيب البلوري. وقد يحدث أحد البروتينات تغيراً شكلياً في موقع صغير لبروتين آخر بالارتباط به وهو نوع من نموذج التوافق المستحث، الذي شوهد من قبل في التفاعلات بين الإنزيمات وركائزها، وصعوبة هذه الفكرة هي أنها إلى حد ما معمة في الطبيعة، في أن الأجسام المضادة يمكنها أن ترتبط بموقع وتشوّه فقط الذي يمكنها التعرف عليه، ويبدو من المستبعد أن يمكن للأجسام المضادة أن تتعرف على موقع ذي تركيب ثلاثي الأبعاد لا يكون إلا بعيد الصلة بشكل الارتباط الصحيح.

والاحتمال الثاني هو أن مركزاً معيناً في بروتين قد يكون إلى حد ما حر الحركة ويمكن أن يتخذ بعض الأشكال التركيبية ذات الصلة، وسوف يحدث الارتباط حينئذ عندما يمر المركز بشكل تركيبى يتعرف عليه الجسم المضاد، وعلى ذلك يعمل الجسم المضاد مثل بالوعة تجذب البروتين إلى هذا الشكل، وهذا النموذج في جوهره يزيد بدرجة كبيرة عدد الأشكال التركيبية التي يساهم فيها الببتيد والبروتين السليم، ويتنبأ بأن للبيبتيدات التي تثير أجساماً مضادة ذات قدرة على التعرف على بروتينات سليمة تقع في مناطق لها حرية حركة شكلية كبيرة في البروتين السليم.

وكاختبار لهذه الأفكار، درس ليرنر وزملاؤه فى سكربس ، جون تينر John Tainer واليزابيث جيتزوف Elizabeth Getzoff، استضادية قطع بروتينية كوظيفة لحرية حركتها الذرية ، وكان بروتين الاختبار الذى اختاروه للتجارب هو بروتين myohaemerythrin، وهو صبغ حامل للأكسجين يوجد فى الحيوانات الدنيا التى تشمل بعض الديدان البحرية، وقد استطاعوا حل التركيب الثلاثى الأبعاد للـ myohaemerythrin بتحليل كاف ليقدم مؤشرات دقيقة لقدرة التحرك الذرية خلال الجزيء، وعلاوة على ذلك، فقد كان البروتين غريباً تماماً على الحيوانات التى اعتادت إنتاج الأجسام المضادة. وعادة لا تصنع الحيوانات أجساماً مضادة لبروتيناتها، وقد تفشل أيضاً فى الاستجابة لإنتاج الجسم المضاد لببتيدات من مصادر أخرى، إذا كان للببتيدات تركيبات مماثلة للتركيبات الموجودة فى البروتينات الطبيعية، وقد اختير بروتين myohaemerythrin لتجنب مشكلة عدم الاستجابة كنتيجة لهذه القدرة على الاحتمال.

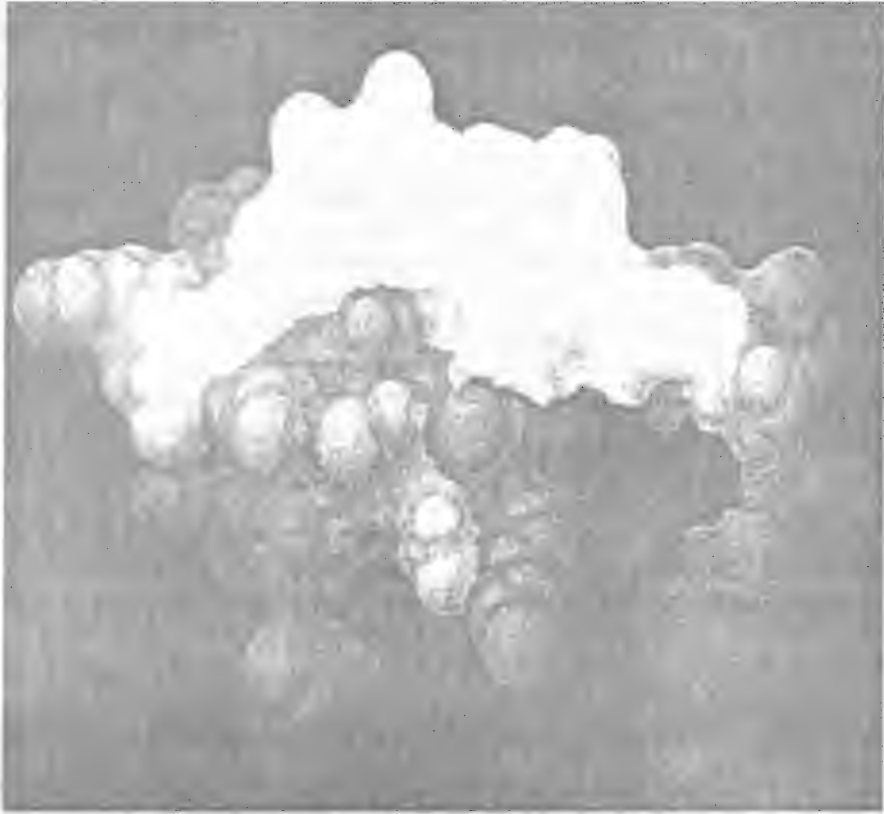
استطاع الباحثون فى سكربس تخليق اثنى عشر ببتيّداً، تمثل قطع جزيء myohaemerythrin بدرجات متفاوتة من القابلية للحركة الذرية، وأثار أحد عشر ببتيّداً من هذه الببتيدات استجابات مناعية قوية، والأجسام المضادة التى نتجت على هذا النحو اختبرت لتفاعلها مع بروتين سليم طبيعى من حيث الشكل . وتفاعلت بقوة الأجسام المضادة التى ولدتها بببتيدات مماثلة لمواقع ذات قابلية تحرك نرى عالية ، بينما لم تبد الأجسام المضادة التى استثارها بببتيدات مماثلة لمواقع ذات قابلية تحرك نرى منخفضة أدنى تفاعل أو أنها لم تتفاعل على الإطلاق مع البروتين السليم (شكل ١٣-٤)، وبعد ذلك ولفترة زمنية قليلة ، بدت مواقع البروتين الأكثر قابلية على الحركة إن بإمكانها أن تتخذ أو تستحث

على اتخاذ أشكال تركيبية مختلفة عن الأشكال التي شوهدت في التركيبات البلورية المستقرة ، وقد يفسر هذا السلوك قدرة الببتيدات المضطربة نسبياً على إثارة أجسام مضادة متفاعلة مع البروتين مرات عديدة. احتفظ بروتين الـ myohaemerythrin بشكله الطبيعي أثناء اختبارات التفاعل مع الأجسام المضادة، حيث لم تتغير سلسلة خصائصه المميزة المرئية التي تعتبر حساسة جداً للتغيرات في التركيب الثلاثي الأبعاد للبروتين، ونتيجة لذلك، يمكن لمولدات المناعة الببتيدية إثارة أجسام مضادة تتفاعل مع البروتينات الطبيعية، و غالباً ما يمكن لمولدات المناعة هذه نفسها أن تولد أيضاً أجساماً مضادة تتفاعل بشكل كامل أو جزئي مع البروتينات التي تغيرت طبيعتها ، وقد يكون لخليط من الأجسام المضادة التي تستطيع أن تتفاعل مع كل من البروتينات الأصلية والبروتينات التي تغيرت طبيعتها منفعة في المعمل أكبر من مستحضر جسم مضاد تقليدي الذي لا يمكنه أن يتفاعل بشكل نموذجي إلا مع مستضد له نفس حالة التشكل مثل مولد المناعة الأصلي.

وقد وجدت علاقة الارتباط بين التولد المضاد والقابلية على الحركة في بروتينات أخرى غير بروتين myohaemerythrin، وعلى سبيل المثال، فقد توصل آرون كلج Aaron Klug من معمل MRC للبيولوجيا الجزيئية في كمبردج بانجلترا و M.H.V. Van Regenmortel من معهد CNRS للبيولوجيا الجزيئية والخلايا في ستراسبورج بفرنسا وزملاؤهم إلى نتيجة مشابهة فيما يتعلق بالبروتين الغطائي لفيروس سفيساء الطبايق، بالإضافة إلى ذلك، فقد أوجدت مجموعة كلج-فان رجنومتريل ومجموعة ليرنر علاقة ارتباط الـ ليزوزيم

والميوجلوبين، وأوجدت مجموعة ليرنر علاقة ارتباط للهيموجلوبين،
واللهيموجلوبين، والسينكروم c ، والريبونكليز والأنسولين.

وقد كشفت دراسات حديثة أيضاً عن الببتيدات أن المراكز المستمنعة
لبروتين قد تكون بالفعل كثيرة جداً ، ولا تقع تماماً على سطح الجزيء، وعلى
سبيل المثال، فقد حددت مجموعة ليرنر المراكز المستمنعة لبروتين
الـ myohaemerythrin باستخدام ببتيديات طويلة قصيرة، وقامت بتحسين سبعة
أرانب بالبروتين السليم ، واختبرت بعد ذلك المصل المضاد للتفاعل مع ما يزيد
على ٢٥٠٠ ببتيدياً، اشتملت كل القطع الست المتبقية المحتملة لبروتين الـ
myohaemerythrin ويتغير تولد المناعة لبروتين تغييراً كبيراً من موقع لآخر ، كما
تتغير أيضاً أنماط استجابات الجسم المضاد في الأرانب السبعة بدرجة كبيرة من
حيوان لآخر، وعلى الإجمال، فقد مالت المراكز الأكثر استمناً لأن تتواجد في
مناطق ذات قابلية تحرك ذرى عالية ، وكثافة تعبئة منخفضة، وشكل محدب
وقدرة الكترولستاتيكية كبيرة ، ومع ذلك، فقد أنتجت الاستجابات المجتمعة من
سبعة أرانب أجساماً مضادة تتفاعل مع مجموعة ببتيديات تحتوى كل فضلات
الحمض الأميني الـ ١١٣ لتسلسل الـ myohaemerythrin، وهذا يعنى أنه في
ظل بعض الظروف تظهر كل فضلة من البروتين فى موقع مستمنع من
الجزيء، ومرة أخرى تقترح النتائج أن البروتينات فى محاليلها ليست
بالتركيبات الساكنة المشاهدة من خلال التصوير بأشعة أكس، لكنها جزيئات
ديناميكية.



شكل ١٢ - نموذج اللحم المتوهج لبروتين myohaemerythrin ، وتظهر المناطق الأكثر قابلية للاستضداد والتحرك في البروتين بالألوان الخفيفة.

التطبيقات المحتملة

Potential applications

تعززت قيمة مولدات المناعة الببتيدية بدرجة كبيرة لقدرتها على توليد مجموعة أجسام مضادة، يتفاعل البعض منها مع البروتين الأصلي ويتفاعل البعض الآخر مع الجزيئات غير المطوية، ونتيجة لذلك، يجب أن تكون الأجسام المضادة مفيدة في كل اختبار تقريباً للكشف عن بروتينات معينة.

تحليل بروتينات معينة

Analysis for specific proteins

لطريقة الببتيد المستمع وجهين يجعلان منه مفيداً بصفة خاصة ، الوجه الأول، هو أن المطلب الوحيد الأساسى لصنع أجسام مضادة تتفاعل مع بروتين معين، هو تسلسل الحمض الأميني للبروتين، ويعتبر هذا المطلب مهماً جداً هذه الأيام، لأنه يتم الحصول على معظم تسلسلات الأحماض الأمينية بواسطة تبديل التسلسلات النكليوتيدية من الجينات المناظرة، وفي الواقع، فأحياناً ما يكون الشيء الوحيد المعروف عن منتج جيني متعارف عليه هو تسلسل حمضه الأميني، فى حين أنه يمكن تخليق الببتيدات المناظرة لأجزاء من هذا التسلسل بطريقة كيميائية واستخدامها فى توليد الأجسام المضادة التى يمكنها القيام بعمل المجسات لتحديد البروتين فى الخلايا.

بالإضافة إلى أن الأجسام المضادة تتعرف على منتجات الجينات البروتينية، فإنه يمكن استخدامها فى اختبار الوظيفة البيولوجية للبروتينات عن طريق تحديد مواقعها الخلوية وتحليل أنشطتها الإنزيمية المحتملة فى أنبوبة الاختبار، والأجسام المضادة مفيدة أيضاً فى تنقية البروتينات بواسطة التحليل الكروماتوجرافى بالتألف المناعى immunoaffinity chromatography، وفى هذا النوع من الكروماتوجرافية، فإن الأجسام المضادة التى تتعلق ببعض أنواع الدعامات الصلبة ترتبط بشكل محدد بالبروتين التى تتعرف عليه، ونتيجة لذلك تزيله من خليط معقد مثل خلاصة الخلية، ويمكن أن تزال البروتينات المرتبطة بصورة محددة بسهولة من الأجسام المضادة بواسطة كميات كبيرة من الببتيد

لمحصن الأصلي، وغالباً ما يمكن بهذه الطريقة، استخلاص إنزيمات فى صورة نشطة.

والوجه الثانى لطريقة الببتيد المستمنع، هى أن الأجسام المضادة تتفاعل مع منطقة صغيرة من البروتين يمكن للقائم بالاختبار أن يختارها مقدماً، حيث يختار الببتيد المستخدم لتوليد الجسم المضاد، ويمكن أن يقال أن للأجسام المضادة تخصصات سابقة التحديد أو سابقة الاختيار، وفى بعض الدراسات التى يكون فيها الكشف عن البروتين هو الهدف الوحيد، لا يكون الموقع الذى مترتب عليه فيه الأجسام المضادة بذى أهمية، ولكن فى بعض الدراسات الأخرى، يعتبر توجيه الأجسام المضادة إلى مركز صغير معين شيئاً أساسياً .

وعلى سبيل المثال، فى الدراسات التى ذكرناها من قبل عن تخليق البروتينات الغلافية لفيروس مولونى سرطان الدم الفأري Moloney leukaemia، فإن تحديد الخطوة التى تنشق فيها قطعة الكربوكسيل الأخيرة للأصل p10E ستكون صعبة جداً فى غياب الأجسام المضادة التى تتفاعل بصورة محددة مع هذا الجزء من البروتين البشير ، وتعد الأجسام المضادة المستهدفة كواشف ممتازة لتتبع مصير جزء معين من بروتين خلال مسارات التصنيع، من أجل تتبع أى التسلسلات المشفرة من الجينات ستستخدم عندما تكون الاختيارات البديلة ممكنة، كما فى حالة الجينات المعاد ترتيبها التى تشفر بنفسها عن بروتينات الجسم المضاد ، ومن أجل إنتاج الأجسام المضادة التى يمكنها التمييز بين البروتينات وثيقة الصلة .

واستخدام الببتيدات كمولدات مناعة قد يكون الطريقة الأكثر عملية والأسهل لصنع أجسام مضادة معينة بكاملها، تستطيع أن تميز بين بروتينات وثيقة الصلة

، فالمستضد Thy-١، الذى يحمل على جميع الخلايا اللمفية T، يعتبر مثلاً ينطبق على ذلك، حيث يوجد هذا المستضد فى صورتين لا تختلفان عن بعضهما إلا فى حمض أمينى واحد فقط من جملة ١١٢ حمضاً أمينياً، ويعتقد أن الصورة المسماة بـ Thy-١،١ بها فضلة أرجنين فى الموضع ٨٩، فى حين يعتقد أن الصورة Thy-١،٢، بها فضلة جلتامين فى هذا الموضع، ولما كان البروتينان لا يختلفان عن بعضهما إلا فى حمض أمينى واحد، فهما يقدمان أسلوب جيد لاختبار ما إذا كان يمكن للأجسام المضادة المضادة للبيتيد أن تميز بين البروتينات وثيقة الصلة .

وقامت هانا ألكسندر Hanna Alexander وزملاؤها فى مجموعة ليرنر بتخليق ستة ببتيدات، مائتت أربعة منها المواقع الثابتة لـ Thy-١،١ و thy-١،٢، وشغل البيبتيدان الآخران الموقع من الحمض الأمينى ٧٩ إلى ٩٨، وكان لأحدهما أرجنين فى الموضع ٨٩، كما فى Thy-١،١، وكان للآخر جلتامين فى الموضع ٨٩ كما فى Thy-١،٢، وتفاعلت أجسام مضادة للبيتيدات من المناطق المحجوزة للبروتينات مع Thy-١،١ و thy-١،٢، فى حين لم تتفاعل الأجسام المضادة للبيتيدات التى شغلت المنطقة المتغيرة إلا مع المتغير المتنبأ به ، وبتوجيه الأجسام المضادة للمنطقة المختلفة ، استطاع الباحثون إنتاج أجسام مضادة محددة لمتغيرات من Thy-١، كان سيصعب الحصول عليها بالطرق التقليدية.

لجسام مضادة تسلك سلوك الإنزيمات

Antibodies that behave like enzymes

قد يصبح من الممكن جعل التخصص المقرر من قبل للأجسام المضادة المضادة للبيتيد anti-peptide antibodies يتقدم خطوة للأمام، وصنع أجسام مضادة ترتبط بنفس التركيبات في البروتينات مثل الإنزيمات، وقد تعتمد الكفاءة الحفزية للإنزيمات على قدرتها على تثبيت بعض حالات عالية الطاقة -حالات العبور كما يطلقون عليها- لجزيئات الركائز ، وقد تقوم الأجسام المضادة التي تتعرف على نفس هذه الحالات بوظائف حفزية، وفي هذه الحالة، فقد يعمل المخزون المناعي من الجسم المضاد كمصدر لأي نوع من الإنزيم، شريطة أن تكون ركيزة الإنزيم موجودة بقدر كاف حتى تكون مستمعة.

وهناك دافع حقيقي لاختبار هذه الأفكار لأنه، مع وجود القدرة الحالية لصنع أجسام مضادة لأي موضع تقريبًا على بروتين، فالنجاح سيكون مساويًا لكونه قادرًا على إنتاج الإنزيمات تشطر البروتينات في مراكز محددة ، هذه الإنزيمات ستشبه إنزيمات القطع التي تقطع الـ د.ن.أ عند مراكز محددة ، فيما عدا أن تخصص الإنزيمات التي تؤثر على البروتينات يمكن أن يختارها القائم بالتجربة.

ولكن كيف يمكن القيام بذلك؟ إحدى هذه الطرق قد تكون مبنية على فرض أن الأجسام المضادة المضادة للبيتيد، تعمل من خلال آلية ملائمة مستحثة، وبذلك تشوه الموقع التي ترتبط به ، فإذا توفرت طاقة إضافية، فقد ينشط البروتين عند مركز الارتباط، وتقوم استراتيجية بديلة بجعل الأجسام المضادة تتوسط في

التفاعل المحفز لجعل التوازن يكون في صالح الانشطار المتحلل مائياً للرابطة البيتيديّة، والأساس، حينئذ، هو واحد من الحفز الاستمناعى.

ولاختبار ما إذا كان الحفز الاستمناعى ممكناً، حاول ألفونسون ترامانتانو Alfonsen Tramantano وكيم ياندا Kim Janda وليرنر Lerner، الحصول على أجسام مضادة أحادية الاستساخ لمادة تحاكي تركيب حالة العبور فى التحلل المائى لأستر، وقام الباحثون بتحصين الفئران بأستر، صمم لكى يكون نظيراً ثابتاً لحالة العبور لحلمأة أسترات كربوكسيلية، وعزلوا الأجسام المضادة الأحادية الاستساخ التى يمكن أن ترتبط بالنظير، واختبرت بعد ذلك الأجسام المضادة من أجل قدرتها على حلمأة أستر، وعجلت ثلاثة منها معدل حلمأة الأستر بمعاملات تصل ما بين ٣١٠ إلى ٤١٠.

وفى تطور مشابه، بدأ بيتر شولز Peter Schulz وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيا فى بركليى بجسم مضاد موجود مسبقاً وأظهروا أنه يمكن أن يحفز على حلمأة مركب يشابه من حيث التركيب مستضد الجسم المضاد.

وتوضح هذه النتائج جدوى الحصول على أنشطة إنزيمية من تخصصات استمناعية، ويمكن أن تكون تطبيقات هذه الطريقة فى كيمياء البروتين والكيمياء الحيوية والطب تطبيقات هائلة، وعلى سبيل المثال، فبدلاً من هندسة الجهاز المناعى لإنتاج أجسام مضادة ترتبط بسهولة بالفيروسات أو المستضدات الورمية، فقد يكون من الممكن إثارة أجسام مضادة تخمد نشاط الفيروسات أو تقتل الخلايا الورمية عن طريق التحفيز على انشطارات بروتينية معينة، وسوف تعمل الأجسام المضادة فى الأساس بطريقة مباشرة دون اعتمادها على مساعدة عوامل أخرى مثل بروتينات النظام المتمم، وبغض النظر عما إذا كانت هذه

التصورات صحيحة بالتفصيل، فإن الأجسام المضادة ذات تخصص سابق تحديده، قد تتخذ قريباً أدواراً تتجاوز وظائف ارتباطها البسيطة .

التطبيقات الطبية للأجسام المضادة المستجلبية بالببتيد

Medical applications of peptide-elicited antibodies

وقد يمكن أيضاً استغلال تخصص الأجسام المضادة المستحثة بالببتيد فى الكشف عن الأمراض البشرية وعلاجها والوقاية منها، وقد تشكل الأجسام المضادة الأساس لنظم التشخيص المناعية للكشف عن وجود الكائنات العضوية الممرضة أو أجسام مضادة للكائنات الممرضة فى عينات إكلينيكية، وقد اعتمدت التشخيصات المناعية لأمراض مثل الدرن tuberculosis فى أغلب الأحوال على مستحضرات بسيطة نوعاً لمستضدات من كائنات ممرضة. ولا يعتبر زراعة كميات كبيرة من هذه الكائنات الممرضة والتعامل معها خطراً فحسب، والتي كان يتطلبها إنتاج كميات مفيدة إكلينيكية من المستضدات ، لكنه كان يصعب وضع معيار للتفاعلات من عبوة لأخرى. وأيضاً، لم تكن تسمح غالباً المستحضرات البسيطة للمستضدات بالتمييز بين عدوى الكائنات الممرضة وثيقة الصلة.

وعلى سبيل المثال، يستخدم اختبار درن الجلد للكشف عن الدرن، الذى تسببه عدوى عصية الدرن الفطرية Mycobacterium tuberculosis، والدرانين Tuberculin (مادة تحتوى بروتين بكتيريا الدرن) هو مرسب حمضى لعصية الدرن الفطرية التى تم الاحتفاظ بها فى مزرعة لعدة أسابيع، وعندما تحقن هذه المادة المستضدية فى الجلد، فإنها تستحث على تفاعل مناعى يتسم بالحمرة والتورم فى المنطقة المحقونة فى الأشخاص الذين تعرضوا من قبل لهذه البكتيريا.

بيد أن فائدة الدرنانين محدودة، لأنه لا يميز بين استجابات حدثت بسبب تعرض سابق لعصية الدرن الفطرية واستجابات سببها التعرض لبكتيريا من نفس عائلتها، وفي بعض مناطق من العالم، ربما تنتج نسبة تصل إلى ٣٠% من تفاعلات الدرنانين الموجبة بسبب التعرض لأنواع أخرى من البكتيريا الدرنية مثل *M.intracellulare* أو *M.fortuinm* وليس بسبب التعرض لعصية الدرن الفطرية .

وسوف يساعد مستضد أكثر تخصصاً لاختبار الجلد في الكشف عن الدرن بدقة كبيرة ، وقد يكون اختبار الجلد هذا مبنياً على استخدام كواشف البيبتيد التخليقية التي يمكن تحديدها بطرق كيميائية ويسهل وضع معايير لها، وقامت مجموعة ليرنر بتخليق ٣١ فضلة بيبتيدية تماثل في التسلسل جزء من بروتين من عصية الدرن الفطرية ،الذى له وزن جزيئى ١٠٠٠٠. ويمكن استخدام البيبتيد كمستضد اختبار للجلد للكشف عن البكتير في حيوانات التجارب،وقد ثبت أنه من أكثر الاختبارات تخصصاً في هذا المجال عن الدرنانين .

وقد يمكن أن تشكل البيبتيدات والأجسام المضادة التي تستحث عليها البيبتيدات أيضاً الأساس في الاختبارات المناعية *immunoassays* للكشف عن العدوى، وقد يكون من الممكن هنا استغلال الحساسية الفائقة لهذه الأجسام المضادة في التمييز بين الكائنات الممرضة من نفس العائلة ،مثل الأنماط المصلية *serotypes* لفيروس، والأنماط المصلية هي أنواع مختلفة من الفيروس التي تكتشف لأنه ينشأ عنها استجابات جسم مضاد مختلفة نوعاً ما في الأفراد المصابين بالعدوى، وعلى سبيل المثال، توجه الأجسام المضادة المحايدة لفيروس التهاب الكبد الوبائي B أساساً ضد المستضد السطحى المسمى *HbsAg*، وهذا البروتين

يحمل أيضاً العلامات الثلاث التي تحدد الأنماط المصلية الأربعة المحتملة للفيروس، اثنان منهما من نوع d (adw وadr) واثنان من النوع y (ayw وayr)، وقد أوضحت دراسات عديدة أن المستضدات السطحية من الأنماط المصلية y وd، يمكن أن تختلف عن بعضها في حمضين من جملة ٢٢٦ فضلة حمضاً أمينياً من تسلسل HbsAg.

ولإنتاج أجسام مضادة يمكنها التمييز بين بروتينين لا يختلفان عن بعضهما إلا اختلافاً قليلاً، سيكون صعباً تماماً إذا استخدمت الأساليب التقليدية، ومع ذلك، يمكن بواسطة مولدات المناعة الببتيدية توجيه الأجسام المضادة إلى المنطقة التي تحتوي على أحماض أمينية رئيسة مختلفة، وقد تم تخليق ببتيدان الفضلة - ١٣، لى تناظر إما التسلسل المحدد-y أو d. ولم تتفاعل الأجسام المضادة التى يولدها "ببتيد-y" إلا مع مستضد سطحى من فيروس من النمط المصلى y، ولم تتفاعل الأجسام المضادة التى حفزها "ببتيد-d" إلا مع المستضد السطحى من فيروس النمط المصلى-d، وقد تشكل هذه الببتيدات الأساس لاختبار مناعى مفيد إكلينيكيًا للنمط المصلى لالتهاب فيروس الكبد الوبائي B، وتشمل المميزات المحتملة لاختبار من هذا النوع على السهولة التى يمكن بها إنتاج الأجسام المضادة المحددة النمط المصلى، دون الحاجة إلى استخدام الكائن الممرض نفسه، والوفرة المتاحة من الببتيد التخليقى كتحكم إيجابى ثابت.

أحد التطبيقات الأكثر إثارة المحتملة لمولدات المناعة الببتيدية، تأتى من إنتاج اللقاحات الآمنة والمحددة كيميائياً للوقاية من الأمراض، ويمكن صنع لقاح كهذا دون الحاجة إلى زراعة أو معالجة كميات كبيرة من العامل الممرض، كما هو مطلوب حالياً لإنتاج معظم اللقاحات التقليدية، وسوف يخلو اللقاح من أى تلوث

بيولوجى، وعلاوة على ذلك، تحظى الببتيدات بثبات رائع فى درجة حرارة الغرفة، تلك الصفة التى ستكون مفيدة على وجه الخصوص فى الدول النامية، التى يمكن أن تظهر فيها مشكلة تبريد عند تخزين اللقاحات.

وعلى الرغم من أن لقاحاً ببتيدياً لم يأخذ طريقه حتى الآن للتطبيق الإكلينيكي، إلا أن العديد منها قد أثبت آمالاً مبشرة إما فى زراعة الأنسجة أو فى النماذج الحيوانية، وتشمل هذه اللقاحات الببتيدية على ببتيدات يمكن أن تضيف بعض مستويات من الوقاية المناعية ضد التهاب الكبد الوبائي B و الحلاء البسيط وسرطان الدم الخبيث، وأمراض القدم والفم وفيروسات شلل الأطفال وداء الكلب، وأيضاً ضد السلالة المسببة للإسهال من بكتيريا أ.كولاي، و ضد الملاريا الطفيلية.

والعمل مع فيروس التهاب الكبد الوبائي B، المسبب لمصل التهاب الكبد الوبائي، يوضح جهود استخدام الببتيدات التخليقية فى اللقاح، وتتصف العدوى بهذا الفيروس بالتهاب شديد للكبد، ويصاب به أكثر من ٢٠٠ مليون شخص فى أنحاء العالم، وعلاوة على ذلك، كانت العدوى بهذا الفيروس فى فترة مبكرة من العمر، ترتبط بقابلية حدوث سرطان الكبد فى مرحلة الصبا.

والأجسام المضادة المحايدة، التى ترتبط بفيروس، وبذلك تؤدى إلى تكميره، هى الأجسام المضادة المهمة للوقاية المناعية، وكما ذكرنا من قبل، فمعظم الأجسام المضادة المحايدة لالتهاب الكبد الوبائي B، يتم توجيهها ضد المستضد السطحي، وقد يكون التغير فى هذه الأجسام المضادة سبباً لتغير النمط المصلى فى الاستجابة المناعية لالتهاب فيروس الكبد الوبائي B. وعلى أساس هذا الافتراض، بحثت مجموعة ليرنر مع مجموعة جون جيرن فى مدرسة الطب

بجامعة جورج تاون بواشنطن ومقاطعة كولومبيا، فيما إذا كان يمكن للبيتيدات التخليقية التي تماثل منطقة النمط المصلي d/y أن تضيف الوقاية المناعية للشمبانزى التي اختبرت عن طريق الإصابة بفيروس التهاب الكبد الوبائي B؟ فالتحصين ببيتيد يحتوى على ٢٨ حمضاً أمينياً، تشغل التسلسل المخصص للنمط المصلي y ، نشأ عنه حماية جزئية أو كلية للشمبانزى التي أصيبت بفيروس النمط المصلي y ، وتدل هذه النتيجة بالإضافة إلى النتائج الأخرى من الكائنات الممرضة المذكورة سابقاً، على أن بيتيداً قصيراً يكون فى استطاعته منح حماية مناعية ضد مركب عامل ممرض وكبير.

بيد أنه ، لما لم تحدث حماية جزئية إلا فى عدة حيوانات، فإن النتائج توضح أيضاً، أنه يجب تعلم الكثير عن كيفية إحداث أفضل استجابة وقائية من مولدات المناعة ، وتتعلق الأسئلة التى يجب أن تدرس بالبيتيد الأكثر فاعلية والدواء المساعف المستخدم والأسلوب المثالى لإعطاء اللقاح للمريض، ويجرى متابعة الإجابات عن هذه الأسئلة فى عددا من المعامل فى العالم ،فى محاولات للحصول على درجة كفاية اللقاح المطلوبة للتطبيقات الإكلينيكية الواسعة الانتشار. وعلى الرغم من أن تخصص الأجسام المضادة التى تستثيرها البيتيدات التخليقية تعتبر ميزة فى بعض التطبيقات، إلا أنها تثير بعض الأسئلة عن فائدة اللقاحات البيتيدية على أسس عالمية النطاق. فتغير حمضين أمينيين فى المنطقة المستهدفة من المستضد السطحى لالتهاب الكبد الوبائي B، يبدو أنها قادرة على إحداث تحويل نمط مصلى، ويحتمل نتيجة لذلك أن تمكن الفيروس من تجنب تدميره بواسطة الأجسام المضادة المحايدة المحددة للنمط المصلى. ودائماً ما يوجد التغير الوراثى فى طائفة ممرضة، وقد يعطى تحصين البشر بأعداد كبيرة

جداً بالبيتيد المحدد لنمط مصلى قوة اختيارية إيجابية لظهور أنماط مصلية أخرى، وكنتيجة لذلك يجعل اللقاح أقل فاعلية.

إلا أنه يمكن التغلب على هذه المشكلة، إما عن طريق تضمين بيتيدات مناظرة لكل الأنماط المصلية المحتملة في الفيروس، أو بتوجيه البيتيدات والأجسام المضادة إلى مواقع مهمة وظيفياً من البروتين، ومن ثم تكون أقل احتمالاً لأن تتطفر، وبالنسبة لفيروس التهاب الكبد الوبائي B، فقد يكفي لقاح محتوى على بيتيدات مناظرة للأنماط المصلية d و y للحماية من هذا الفيروس، لأن كل المستضدات السطحية لفيروس التهاب الكبد الوبائي B، إما من النمط المصلي d أو y.

وبالنسبة للفيروسات التي تظهر قدراً كبيراً من تغير النمط المصلي، مثل الفيروس الذى يسبب مرض القدم والفم، فقد يكون تضمين كل المتغيرات الممكنة مجدياً، وبالنسبة لهذه الكائنات الممرضة، فقد يكون من الأفضل التركيز بدلاً من ذلك على التسلسلات المحفوظة بين الأنماط المصلية العديدة، ويحتمل أن تشمل هذه التسلسلات على مناطق الجزيء المهمة وظيفياً التى لا تستطيع تحمل التغير، وقد تصنع لهذا السبب أهدافاً مناسبة للأجسام المضادة المحايدة. وعلى سبيل المثال، حاول روبرت نيوراث Robert Neurath وزملاؤه فى مركز الدم بمدينة نيويورك توجيه أجسام مضادة مضادة للبيتيد لمنطقة محفوظة ومهمة وظيفياً لفيروس التهاب الكبد الوبائي B، والمستضد السطحي للفيروس يشفر عنه جين env، الذى يمكنه أن يحدد قرابة ٤٠٠ حمض أمينى، وتشكل الـ ٢٢٦ حمضاً أمينياً فى النهاية الكربوكسيلية لهذا التسلسل المستضد السطحي الناضج، ويسمى التسلسل المشفر المناظر بمنطقة S أو بجين S، ويسمى د.ن. env،

الذى يسبق جين S، بالتسلسل أو الجين السابق L-S، ويوجد البروتين السابق L-S فى جزيء الفيروس المعدى، ويظهر أنه يستخدم فى ربط الألبومين المتبلمر بالفيروس. وهناك افتراض بأن هذا الموقع الرابط يلعب دوراً فى ربط الفيروس بخلايا الكبد، والذى يعتبر ضرورياً لحدوث العدوى .

وهناك ببتيدياً يتكون من ٢٦ حمضاً أمينياً من النهاية الأمينية للبروتين السابق L-S، يحتوى على محدد مستضد سائد للبروتين والفيروس، وتكتشف الأجسام المضادة لهذا الببتيد مبكراً خلال دورة عدوى فيروس التهاب الكبد الوبائي B فى البشر، وقد يقم الأساس لاختبار مناعى لتشخيص مصل التهاب الكبد الوبائي .

وعندما يستخدم الببتيد المحتوى على ٢٦ حمضاً أمينياً كمستمنع، فإنه يستثير أجساماً مضادة ترتبط بالبروتين السابق L-S، وتمنع ارتباط جزيئات الفيروس بالألبومين المتبلمر. وتوحى هذه النتيجة بأن الببتيدات قد تصبح قادرة على التدخل مع الفيروس المرتبط بخلايا الكبد، وتمنع بالتالى المرحلة الأولى من العدوى، ويمكن أن يمنح تحصين الشمبانزى بالببتيد حماية مناعية ضد تحد قائم من فيروس التهاب كبد وبائي B خبيث.

ويمثل الببتيد السابق L-S محدد مستضد يشترك فيه جميع فيروسات التهاب الكبد الوبائي B، بحيث أنه يجب أن يمنح التحصين بالببتيد حماية ضد أى نمط مصلى من الفيروس أساساً، وعلاوة على ذلك، فإذا غير الانحراف الوراثي genetic drift التسلسل المستهدف فى الفيروس بحيث لا تستطيع الأجسام المضادة المتولدة من الببتيد أن ترتبط به بعد ذلك، فقد يتغير التسلسل تماماً إلى الدرجة التى لا يستطيع بعدها أن يرتبط بخلايا الكبد أيضاً، وبمعنى آخر، فقد

تظهر الطفرات التى تتجو من مراقبة المناعة، عن طريق تغيير تسلسل الحمض الأمينى للموقع الببتيدى السابق ل-S، أنها غير معدية.

الخلاصة

أصبحت الببتيدات والأجسام المضادة التى تحفز عليها الببتيدات أدوات بحث مهمة لعالم البيولوجيا الجزيئية وكيميائى البروتين، بالرغم من بعض المقاومة الأولية من جانب المجتمع المناعى لقبول المستضدات الببتيدية، كطريقة عامة لإنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين، فتأثير هذه الكواشف على جهود البحث الأساسية مستمر فى النمو، بشهادة الزيادة السنوية فى حجم الأبحاث المنشورة التى تستخدمها بإحدى الطرق، وتقدم الببتيدات والأجسام المضادة التى تحفز عليها، مفاهيم مهمة عن تركيب البروتينات فى محاليلها والعلاقة بين تركيب البروتين ووظيفته.

وقد فتحت الكواشف أيضاً طرق جديدة لدراسة وظائف الجهاز المناعى، فهى تستطيع المساعدة على تحديد الطبيعة الكيميائية الدقيقة للمحددات التى تتعرف عليها الخلايا T، والتغير المناعى والاستضادى، وهى آلية التحمل المناعى، وتنظيم الاستجابات المناعية، بالإضافة إلى ذلك، يجرى استخدام الببتيدات حالياً كمستمنعات لإنتاج الأجسام المضادة الأحادية الاستنساخ، وبهذه الطريقة، يجرى ضم التكنولوجياين للحصول على إنتاج سهل لكميات كبيرة من الأجسام المضادة النقية التى تتفاعل مع أهداف محددة بدقة ومختارة مسبقاً .

ويمكن تخليق الببتيدات في المعمل بسهولة، ومن السهل نسبياً، إنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين، ومع ذلك، يصعب استخدام النظم المستخدمة لتوليد الأجسام المضادة في معمل الحيوانات على وجه العموم في تحصين البشر أو الحيوانات الأليفة، ونتيجة لذلك، يجب الإجابة عن عدد من الأسئلة قبل تطبيق تكنولوجيا التحصين لمنع الأمراض المهمة إكلينيكياً، وتتعلق هذه الأسئلة بتصميم الببتيد الأكثر فاعلية، واختيار الحامل المثالي والمساعد وتحديد جرعات اللقاح، وعمل جداول وطرق لإعطاء الدواء والتي تعتبر أساسية للوقاية من المرض.

ويجب أن تؤخذ في الاعتبار أيضاً، قدرة الببتيدات على إحداث الاستجابات المناعية المناسبة لتوفير الحماية، وتأثير الجينات العديدة التي تنظم هذه الاستجابات، ومع ذلك، ولما كانت مولدات المناعة الببتيدية تظهر سمات لقاح مثالي مثل التخصص والثبات وسهولة التصنيع، وقلة احتمال تلوث بيولوجي فإن الأسئلة تلقى أولوية كبيرة في المعامل البحثية في مختلف أنحاء العالم، ويمكن توقع تقدم كبير نحو تحقيق هدف لقاح مفيد إكلينيكياً ذي أساس ببتيدي على مدى السنوات القليلة القادمة، ومن الاحتمالات المبشرة بالأمل، تلك الاستخدامات الممكنة للكواشف الببتيدية للتشخيص المناعي للمرض.

وهذا الهدف يعد الأقرب في الوصول إليه عن لقاح، ويمكن توقع اختبار مناعي ذي أساس ببتيدي في غضون السنوات القليلة القادمة.

الفصل الرابع عشر

طرق جديدة لتشخيص الأمراض الوراثية

New methods for the diagnosis of genetic diseases

أحدثت تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم تغييراً جوهرياً في دراسة الأمراض الوراثية البشرية، والعديد من هذه الأمراض سببها طفرات جينية نشأت إما بسبب الغياب الكامل لمنتج بروتيني وظيفي، أو بسبب وجود بروتين معيب لا يعمل على الوجه الصحيح، وتقدم تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم طرق جديدة للكشف عن هذه الآفات الوراثية، وبذلك تتيح تحديد دقيق وحصر موضعي لهذه العيوب التي تسبب الأمراض الوراثية، وكنتيجة لذلك، فإن العديد من الحالات يمكن أن تشخص في الجنين fetus في مرحلة مبكرة من مراحل الحمل، وعلاوة على ذلك، فالحالات الحاملة للأمراض التي لم يكن في الإمكان اكتشافها من قبل لبعض التشوهات الوراثية يمكن التعرف عليها حالياً، وكانت النتيجة أن أمكن إطلاع آباء المستقبل على الاختيارات الوراثية فيما إذا كانوا يرغبون في بدء حمل أو استمراره.

وبالنسبة للأمراض التي لم يعرف بعد طبيعة عيوبها الوراثية ومواقعها المحددة، فإنه يجري استخدام طرق الـ د.ن.أ. المطعم لتحديد المواقع الكروموسومية التي تقع بها الجينات المصابة، وتشمل هذه الأمراض مرض تليف المثانة cystic fibrosis ومرض هنتجتون Huntington's disease، وهناك جهود مكثفة جارية للتعرف على الجينات الخاصة التي يدور حولها البحث، ولن يخدم

هذا مجال التشخيص فقط، لكنه قد يؤدي أيضًا إلى فهم أفضل لأسس الكيمياء الحيوية للحالات، وربما إلى طرق علاج أكثر فاعلية، وأخيرًا، فقد كانت التكنولوجيا على درجة كبيرة من الفائدة لفهم التاريخ الطبيعي للأمراض الوراثية، حيث أُلحقت تتبع أصول وهجرات الجينات الطافرة، وتقدير عدد المرات التي ظهرت فيها نفس الآفات الوراثية في مجتمعات أخرى.

أنيميا الخلية المنجلية والثلاسيميا

Sickle cell anaemia and thalassemia

ظهرت قوة تحليل الـ د.ن.أ واضحة لأول مرة مع مرض الخلية المنجلية ومرض فقر الدم البحر (الثلاسيميا)، وهما من الأمراض الموروثة التي تتصف بإنتاج هيموجلوبين شاذ، وعلى الرغم من وجود العديد من الأمراض الوراثية البشرية المختلفة، إلا أن تلك الأمراض الموجودة في الهيموجلوبين، تعتبر من بين أهم المشاكل الصحية في العالم، فالهيموجلوبين، الذي يعتبر للبروتين الغالب على خلايا الدم الحمراء، يعمل أساسًا على نقل الأكسجين من الرئتين إلى الأنسجة، ويتكون جزيء الهيموجلوبين من أربع وحدات بروتين تحت فرعية، يحمل كل منها جزيء من الهيم الحامل للحديد، الذي يعمل على ربط الأكسجين، وتسمى سلاسل البروتين بالجلوبيينات globins.

وهناك ستة أنواع رئيسية من الجلوبيينات، سميت بأسماء ألفا وبيتا وجاما وديلتا وأبسيلون وزيتا، وجدت في الهيموجلوبينات البشرية الطبيعية (جدول ١٤-١)، وتنتج هذه الجزيئات الجلوبينية بصورة منتظمة خلال مراحل حياة المضاغة والجنين والشخص البالغ، وتنتج المضاغة (مرحلة ما قبل الجنين) أولاً جلوبيينات

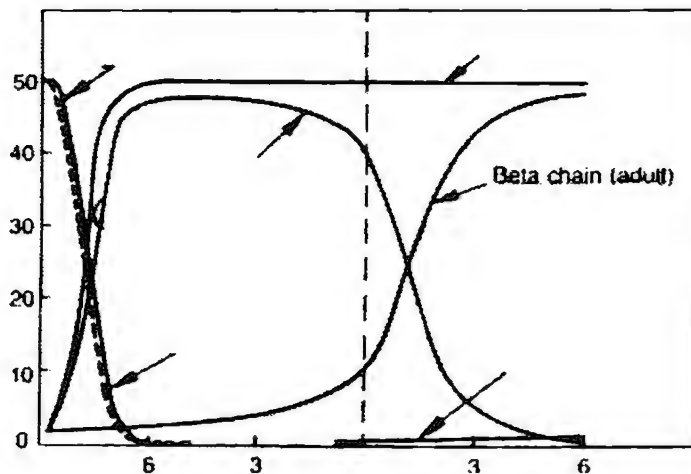
أبسيلون وزيتا، ويتكون جزيء الهيموجلوبين حينئذ من اثنين من كل من هذه السلاسل، وفي حوالى الشهر العاشر من الحمل، يحل محل جلوبينات أبسيلون وزيتا سلاسل من جلوبين ألفا وجاما، التى تتحد لتكون الهيموجلوبين F، وهو الهيموجلوبين الرئيس لحياة الجنين، وقبل موعد الولادة بفترة قصيرة، يتناقص إنتاج سلسلة جلوبين جاما ويحل محلها تخليق جلوبين بيتا، ويسمى النوع الرئيس من هيموجلوبين الأشخاص البالغين بـ HbA₁، ويتكون من سلسلتين من سلاسل ألفا وسلسلتين من سلاسل بيتا، ويوجد أيضاً جلوبين بنسبة أقل فى الأشخاص البالغين، وهو HbA₂، والذى يحتوى على سلسلتين من سلاسل ألفا وسلسلتين من سلاسل دلتا ويشكل حوالى ٢,٥% من المجموع (شكل ١٤-١).

جدول ١٤-١ أنواع الجلوبين الرئيسة فى الهيموجلوبين البشرى

الهيموجلوبين	أنواع الجلوبين	الذى ينتجه	نسبته فى الشخص البالغ
A	$\alpha_2\beta_2$	الشخص البالغ	٩٧
A ₂	$\alpha_2\delta_2$	الشخص البالغ	٢,٥
F	$\alpha_2\delta_2$	الجنين والشخص البالغ	> ١
Portland I	$\xi_2\epsilon_2$	المضغة	-
Portland II	$\xi_2\delta_2$	المضغة	-

ويمكن أن تؤثر التشوهات الوراثية على تخليق أية سلسلة من السلاسل الجلوبينية، وبما أن HbA₁ هو الهيموجلوبين الرئيس فى حياة الشخص البالغ، فإن الانحرافات التى تؤثر على إنتاج أو تركيب أو وظيفة سلاسل ألفا

وبيتا، يمكن أن تسبب اضطرابات مهمة إكلينيكية ، ويمكن تقسيم هذه الاضطرابات بشكل عام إلى فئتين : الأمراض الهيموجلوبينية haemoglobinopathies، التي تنتج فيها البروتينات الشاذة، كما في حالة مرض الخلية المنجلية، وأمراض الثلاسيميا، والتي إما لا ينتج فيها أحد سلاسل الجلوبيين على الإطلاق، أو تنتج بكميات غير كافية، ومع ذلك يظل تركيبها سليم.



شكل ١٤-١ نمط تخليق سلسلة جلوبيين أثناء حياة الجنين و ما بعد الولادة.

وتنشأ هاتان المجموعتان من الأمراض بسبب طفرات متحيدة، وتورث تبعاً لقوانين مندل، ولكي يظهر المرض الوراثي يجب أن يكون الفرد متجانس

الزيجوت $homozygous$ ، وله جيناً معيناً في كل من زوج الكروموسوم المعين، وإذا كان كلا الأبوين حاملاً متغاير الزيجوت $heterozygous$ ، لديه جين طافر في كروموسوم واحد فقط، فسيصبح لكل طفل فرصة واحد من أربعة لورثة نسختين من الجين الطافر، ونتيجة لذلك ينشأ مرض أنيميا الخلية المنجلية أو الثلاسيميا، وليست لدى حاملي المرض أعراض واضحة له، بينما يمكن الكشف عنها في اختبارات الدم، وتصيب أمراض أنيميا الخلية المنجلية والثلاسيميا بصفة أساسية شعوب أفريقيا، ومنطقة البحر المتوسط، والشرق الأوسط، وآسيا.

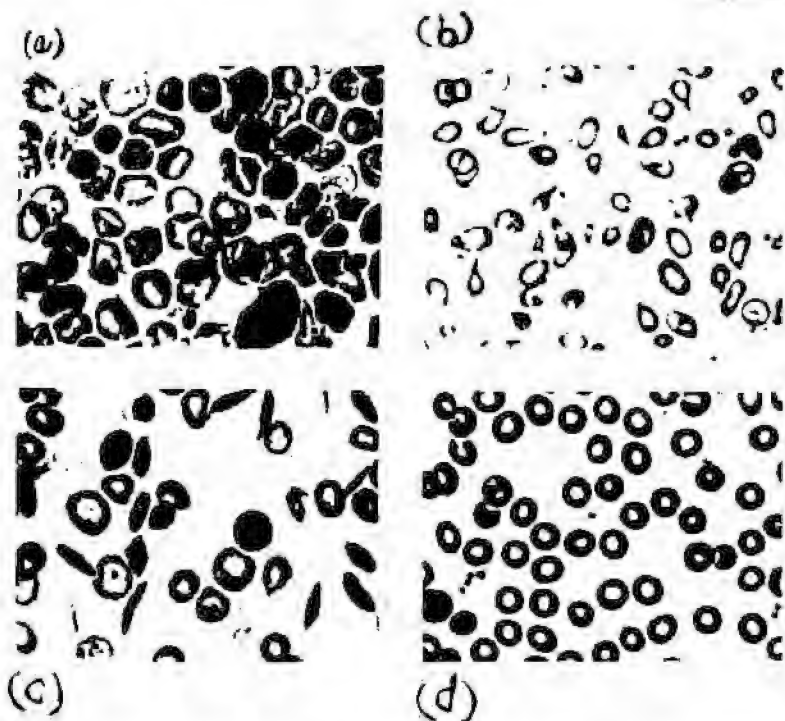
أنيميا الخلية المنجلية

Sickle cell anaemia

من مئات الطفرات التي يمكن إما أن تؤثر على سلاسل هيموجلوبين ألفا وبيتا، يكون أكثرها أهمية تلك الطفرة التي تسبب مرض أنيميا الخلية المنجلية، ويحدث طفر الخلية المنجلية في الحمض الأميني السادس من الـ ١٤٦ حمضاً أمينياً التي تشكل سلسلة جلوبين بيتا، ويتغير حمض الجلوتاميك Glutamic acid، وهو الحمض الأميني الطبيعي في هذا الموضع من السلسلة إلى حمض الفالين Valine، نتيجة لتغير قاعدة واحدة في الكودون ٦ من الجين المناظر، ويؤدي هذا الاستبدال لذلك الحمض الأميني الواحد إلى تغيير خصائص جزيء الهيموجلوبين، ويحدث نتائج إكلينيكية خطيرة.

١ - متجانس الزيجوت أو متجانس اللواقح: في علم الوراثة، يقال أن أحد الأفراد متجانس اللواقح بالنسبة إلى صفة معينة، عندما يكون عنصرا المورثتين اللتين تحملان هذه الصفة متشابهتين، والعكس متغاير الزيجوت. (معجم المصطلحات الزراعية للشهابي). المترجم

وعندما يفقد الهيموجلوبين الشاذ أكسجينه في الأنسجة، فإن جزيئاته تتكدس مع بعضها مكونة لليافات fibrils، تضيف صلابة على خلايا الدم الحمراء المرنة ثنائية النقر، وتشوهها بأشكال تشبه المنجل (أشكال ١٤-٢ أو ١٤-٢ب)، ولا تستطيع الخلايا الانتقال بسهولة خلال الأوعية الدموية الصغيرة، التي تصبح مسدودة بالخلايا، ويعانى الأشخاص المصابين ألماً مبرحاً نتيجة الأزمة الحادة والمؤلمة، وتتلّف أجهزة الجسم الحيوية، وتحدث أنيميا انحلال خلايا الدم haemolytic anaemia، حيث تتحطم الخلايا المنجلية الصلبة فى الدورة الدموية بصورة مبسرة.



شكل ١٤-٢ خلايا الدم الحمراء لشخص طبيعي (a)، ومرض مصفون يقريبا الخلية المنجلية (b) ومرض مصفون بتلاسيميا بيتا متجلس الزيجوت (c) والتالا- تلاسيميا متجلس الزيجوت (d)

الثلاسيميا (فقر الدم البحرى)

Thalassaemia

تنقسم أمراض الثلاسيميا إلى مجموعتين رئيسيتين: ثلاسيميا ألفا وبيتا، والتي تخلق تبعاً لها سلسلة الجلوبيين بكميات شاذة، ففي الصورة متجانسة الزيجوت من ثلاسيميا ألفا، تكون سلاسل جلوبيين ألفا غائبة، ويتكون الهيموجلوبين الأولى فى دم الجنين من أربع سلاسل من نوع جاما، وهو الهيموجلوبين الذى لا يعمل بصورة فسيولوجية فى نقل الأكسجين، وتوجد خلايا الدم الحمراء ناقصة النمو فى الدورة الدموية (شكل ١٤-٢٠) وتكون الأجنة فى حالة أنيميا شديدة وتعانى من حالة تعرف بالحبس الجنيني (hydrops fetalis)، وغالباً ما تموت خلال الشهور الثلاثة الأخيرة من الحمل أو خلال أيام قليلة من الولادة، والخلايا الحمراء فى الأشخاص المصابين تكون أصغر من مثيلتها فى الأشخاص الطبيعيين، وتحتوى على كميات قليلة من الهيموجلوبين (شكل ١٤-٢٠ ج)، ويتطلب الأمر فى هذه الحالات عمليات نقل دم بصورة منتظمة للحفاظ على تركيزات الهيموجلوبين بنسب كافية، ولتعويض الأنيميا، تتمدد كتلة نخاع العظم فى المرضى، وتمتص الحديد الموجود فى الوجبة الغذائية بصورة شاذة، ويتسبب الامتصاص المتزايد المقترن بالحمل الزائد من الحديد فى ترسيبات ثقيلة من الحديد فى الأنسجة، وإلى تلف العديد من أجهزة الجسم بما فيها القلب والكبد.

وحتى فترة قريبة، كان مرضى ثلاسيميا بيتا بصفة عامة يتوفون أثناء مرحلة الطفولة بسبب الإصابة بالمرض، أو يموتون فى مرحلة البلوغ نتيجة فشل القلب الناجم عن حمل الحديد الثقيل، وقد تحسنت التقديرات المحتملة للإصابة

بالمرض بصورة كبيرة خلال الخمسة عشر عامًا الماضية، كنتيجة للعلاج بنظام تغذية يتكون من عمليات نقل دم متكررة، بالإضافة إلى الحقن اليومي بعقار الدفركسامين deferroxamine للتخلص من الحديد من الأنسجة، وتجاوز بعض المرضى حالياً الثلاثين من أعمارهم.

ويكتمل التشخيص الإكلينيكي لأنيميا الخلية المنجلية أو الثالاسيميا بواسطة فحص الدم، وفي ظل ظروف من تركيز أكسجين منخفض، يمكن تمييز خلايا الدم الحمراء المنجلية بسهولة تحت الميكروسكوب، ويمكن أن ترى بوضوح أيضاً قطر خلايا الدم الحمراء الصغيرة ومحتوى الهيموجلوبين المتناقص الذى يميز الثالاسيميا خلال الفحص الميكروسكوبي، ويمكن تأكيد التشخيص من خلال فحص الهيموجلوبين نفسه، ويمكن تمييز الخلية المنجلية والهيموجلوبينات الطبيعية بسهولة، كما يمكن تمييز التغيرات المميزة فى جلوبينات من نوع ثالاسيميا ألفا أو بيتا.

تشخيص ما قبل الولادة

Parental diagnosis

مع استثناءات قليلة، لا يمكن حالياً تصحيح العيوب الأساسية للأمراض الوراثية، ونتيجة لذلك، توجه معظم طرق العلاج نحو الوقاية أو العلاج المبكر للمضاعفات الناجمة عن المرض، ففي مرض الخلية المنجلية، على سبيل المثال، تعتبر الإصابة سبب شائع للوفاة فى فترة الطفولة، ويفضل التشخيص المبكر بحيث يمكن إعطاء الأطفال المصابين مضادات حيوية تساعد على منع الإصابة، والرعاية الطبية عند ظهور أعراض المرض الأولية فى حالة

تطور الإصابة، وعلى الرغم من أن نمو وتطور الأفراد المصابين بـthalassaemia بيتا قد تحسن بصورة كبيرة من خلال عمليات نقل الدم والحقن اليومي بعقار سفروكسامين، إلا أن المرضى يحتاجون برغم ذلك إلى علاج طبي مستمر ، ونقلهم إلى المستشفيات في حالة المضاعفات.

وإحدى طرق التحكم في الأمراض الوراثية هي منع إنجاب الأطفال المصابين، حيث يمكن إطلاع أعضاء الأسر الذين لديهم خطر متزايد من الإصابة بمرض وراثي على طبيعة وطرق انتشار المرض، واختبارهم بصورة منتظمة للتعرف على الأشخاص حاملي المرض، ومن خلال هذه المعلومات، يمكن التعرف على الأشخاص الذين هم في خطر من إنجاب طفل بمصاب بالمرض والنشاور معهم حتى يكونوا على دراية تامة بخيارات الإنجاب، فهم لديهم حق اختيار منع الحمل كلية، أو في حالة ما إذا كانوا يرغبون في إنجاب طفل، أن تجرى عليهم تشخيصات ما قبل الولادة، ويجهز الجنين المصاب ، وقد تطورت على مدى العشر سنوات الماضية الاختبارات الآمنة لتشخيص ما قبل مرحلة الولادة لأمراض الخلايا المنجلية والثلاسيميا.

تحليل دم جنيني

Fetal blood analysis

كانت المحاولات الأولى لتشخيص ما قبل الولادة لأمراض الخلايا المنجلية والثلاسيميا محاولات بسيطة ، ولما كانت الأمراض تظهر بشكل واضح في الدم، فيمكن الحصول على عينة صغيرة من دم الجنين وفحصها للكشف عن وجود أو غياب الهيموجلوبينات الشاذة، وفي فترة السبعينات، طورت طرق

للحصول على عينات دم من الجنين، وكانت هذه الطريقة الجديدة لتشخيص ما قبل الولادة ناجحة تمامًا، ولا تزال طريقة أخذ عينة من دم الجنين، هي الطريقة الأساسية في تشخيص ما قبل الولادة لمرض ثلاسيميا بيتا في بعض الدول الأوروبية على الرغم من عيوبها العديدة.

وعادة ما يطبق هذا الإجراء في فترة متأخرة تمامًا من الحمل - في حوالي الأسبوع الثامن عشر من الحمل - ولا يتم الوصول إلى التشخيص إلا عند الأسبوع العشرين، فإذا قرر الأبوين إنهاء الحمل حينئذ، فيجب أن يتم الإجهاض في أواخر الحمل، عندما تكون المخاطر الطبيعية على المرأة كبيرة والتأثيرات الفسيولوجية متعاضمة، وعلاوة على ذلك، فإن سحب دم من الجنين ليس إجراء روتينياً، ولا يستطيع القيام به إلا خبراء متخصصين قليلين في طب التوليد. ويصاحب هذا الإجراء بعض المخاطر على الجنين، تشمل على النزيف والعدوى، على الرغم من أنه يمكن التقليل من هذه المخاطر مع أيدي خبيرة، وفي حالات قليلة من مرض ثلاسيميا بيتا، لا تتمكن الطريقة المستخدمة في تحليل دم الجنين من أن تميز بشكل قاطع بين الحالات الحاملة للمرض والحالات المصابة بالمرض.

تحليل الد.ن.أ.

DNA analysis

منذ فترة الستينات، استخدمت عملية سحب الصاء Amniocentesis (وهي سحب عينة من سائل السلى للفحص) للحصول على أنسجة جنينية لتشخيص عيوب ما قبل الولادة، وفي هذا الإجراء، يتم إدخال إبرة مجوفة خلال الجدار

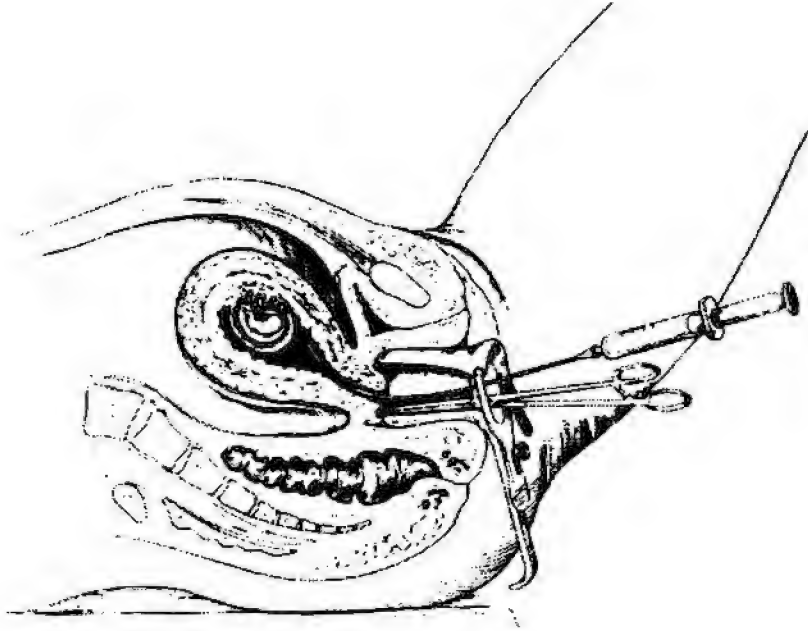
البطنى للمرأة الحامل ومنه إلى داخل السائل الذى يملأ الكيس الأمنيونى المحتوى على الجنين، ويمكن سحب عينة من السائل الأمنيونى amniotic fluid، والذى يحتوى على خلايا من أصل جنينى بواسطة إبرة، وتؤخذ الخلايا الأمنيونية من الأمنيون (الغشاء المبطن للمشيمة والمفرز للنخطة)، أو جلد الجنين أو من الجهاز التنفسى والجهاز الهضمى الجنينى.

وللكشف عن عيوب كروموسومية، مثل تلك العيوب التى تسبب متلازمة دون Down's syndrome، يجرى زراعة الخلايا فى مزرعة، ويتم تحليل كروموسومات الخلايا المنقسمة، ويعطى تحليل إنزيمات خلال الجنين المستزرعة معلومات عن العيوب الإنزيمية الوراثية، مثل ذلك العيب الذى يسببه داء تاي ساكس Tay-Sachs، ويمكن أن يعطى تحليل المواد الكيميائية فى السائل الأمنيونى معلومات عن وجود بعض التشوهات المتطورة، وعلى سبيل المثال، فى حالة الصلب الأشرم spina bifida، وهى الحالة الخطيرة التى لا يتكون فيها العمود الفقرى بصورة طبيعية، يرتفع تركيز ألفا- بروتين الجنينى alpha-fetoprotein فى السائل الأمنيونى، ومع ذلك، لا يعطى السائل الأمنيونى خلايا دم حمراء، ونتيجة لذلك، لا يمكن استخدام سحب الصاء فى البداية لتشخيص أنيميا الخلية المنجلية والثلاسيميا، ولا يمكن استخدامه فى الكشف عن الأمراض الوراثية، التى تكون فيها البروتينات المصابة غير معروفة. وكان مجيء تحليل الدم د.ن.أ. للكشف المباشر عن الطفرات الجينية، والذى تم فى أواخر السبعينات، أن أفسح مجالاً واسعاً لتشخيص ما قبل الولادة.

والتطور الآخر الذى ساعد فى هذا المضمار، هو استخدام العينة الحية من الخمل المشيمى chorionic villus biopsy، وهى طريقة جديدة للحصول على الخلايا الجنينية والد.ن.أ.، ولم يكن فى الإمكان تجريب طريقة سحب الصاء إلا بعد الأسبوع الخامس عشر من الحمل، وكان يتطلب زراعة وتحليل

الخلايا أسبوعان آخرين. وهذا يعنى مرة أخرى، أنه، إذا اختيرت عملية الإجهاض، فكان يجب القيام بها فى أواخر فترة الحمل، وقد جعلت طريقة أخذ عينة حية من الخمل المشيمى من تشخيص ما قبل الولادة تشخيصاً ممكناً فى فترة مبكرة جداً من مرحلة الحمل، وغشاء الحميل البراني، chorion، والذى يعتبر غشاء آخر من الأغشية المغلفة للجنين أحد المصادر الجنينية. وتحاط المضغة الأولية ببروزات ميكروسكوبية من غشاء الحميل البرانى التى تسمى بالخملات villi أو الزغب (شكل ١٤-٣ و ١٤-٤). ويمكن جمع القليل من الزغب إما بواسطة العينة الحية أو الجفت forceps، أو عن طريق السحب بقسطرة، للحصول على د.ن.أ. لتحليله، ولما كان من الممكن إجراء طريقة أخذ عينة حية من الخمل المشيمى بين الأسبوع السابع والعاشر من الحمل، ولا تتطلب فترة طويلة لاستزراع خلية، فتتيح هذه الطريقة إجراء تشخيص ما قبل الولادة خلال الشهور الثلاثة الأولى من الحمل.

وقد استخدم هذا الأسلوب فى الدول الاسكندنافية فى أوائل السبعينات، وفى الصين وروسيا فى منتصف السبعينات، وقد استعاد نشاطه فى الآونة الأخيرة فى أوروبا والولايات المتحدة، وتدل النتائج الأولية لدراسة جماعية أخذة فى التطور حالياً فى العديد من المراكز الطبية لتقييم أمان طريقة أخذ عينة حية من الخمل المشيمى على أن مخاطر هذه الطريقة قليلة.



شكل ٣-١٤ طريقة إجراء أخذ عينة حية من زغب المشيمية عن طريق السحب بقبوينة قسطرة.

(a)



شكل ٤-١٤ منظر ميكروسكوبي لزغب المشيمية مزالة أثناء أخذ العينة الحية (a). وصورة مكبرة لزغبة واحدة (b).

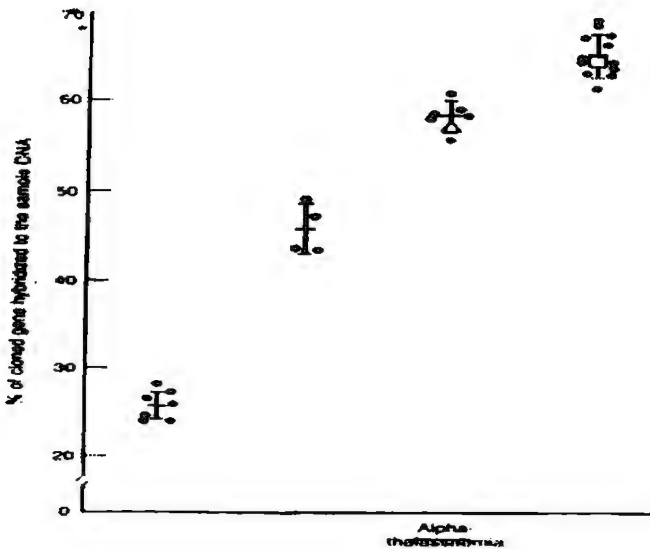
تطور تحليل ال د.ن.أ

Development of DNA analysis

فى عام ١٩٧٦، أصبح ثالاسيميا ألفا أول مرض وراثى يجرى تشخيصه بطريقة ناجحة من خلال تحليل ال د.ن.أ قبل الولادة، وتتضاعف جينات جلوبين ألفا الوظيفية فى البشر، ويصبح لكل فرد أربعة نسخ من الجين فى كل خلية، اثنان على كل عضو من زوج الكروموسوم ١٦، وفى الصورة القائلة من مماتل الزيجوت لثالاسيميا ألفا، تحذف جميع جينات جلوبين ألفا الأربعة من الكروموسومات، ويمكن إجراء التشخيص بتحديد ما إذا كان ال د.ن.أ من الخلايا التى تم الحصول عليه بواسطة سحب الصاء، يحتوى على أى من جينات جلوبين ألفا .

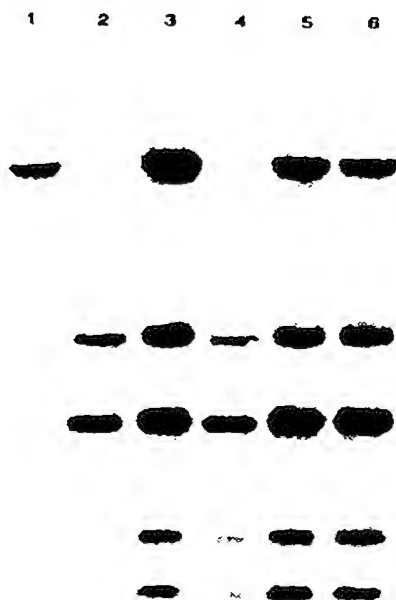
وفى الدراسات الأولية على تشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا ألفا، استخدم يويت واى كان Yuet Wai وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيا بسان فرانسيسكو طريقة تهجين تعمل فيها نسخة مشعة من جين جلوبين ألفا كمجس للكشف عن الجين فى د.ن.أ الشخص، وعندما يخلط المجس المشع ود.ن.أ الشخص معاً فى محلول فإن المجس يلتصق بـ د.ن.أ جين جلوبين ألفا . وفى ظل ظروف بالغة التحكم، تتعلق درجة هذا التهجين فى د.ن.أ الشخص بعدد نسخ جين جلوبين ألفا الموجود، ويمكن بذلك أن تحدد ما إذا كان الفرد له صورة متجانسة الزيجوت من ثالاسيميا ألفا (شكل ١٤-٥). وعلى الرغم من جدوى طريقة التهجين إلا أنها صعبة من الناحية الفنية، وتتطلب كميات كبيرة من ال د.ن.أ، الذى لا يمكن الحصول عليه إلا عن طريق استزراع خلايا السائل الأمنيوى لمدة تتراوح ما بين ثلاثة إلى أربعة أسابيع.

وكان لاكتشاف إنزيمات القطع restriction enzymes (انظر الفصل الأول) وتطور تحليل بقعة تاوثرن Southern blot، أن بسطا إلى حد كبير تشخيص ما قبل الولادة في اضطرابات الهيموجلوبين، ويمكن أن تكتشف هذه الطرق التغيرات النوعية في الجينات، التي تشمل طفرات النكليوتيدات الفردية بالإضافة إلى التغيرات الكمية في عدد الجينات التي تنشأ بسبب إلغائها، ويمكن توضيح تطور هذه الطرق من خلال استخدامها في الكشف عن ثلاثة أنواع رئيسة من الطفرات في نظام الجلوبيين، أى الأنواع الناشئة عن ألفا- ثالاسيميا، وأنيميا الخلية المنجلية وthalassaemia بيتا.



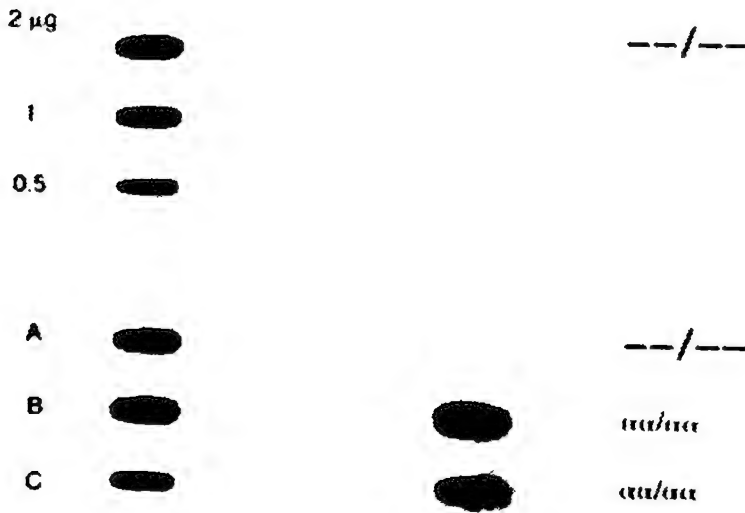
شكل ١٤-٥ قياس عدد جينات جلوبيين ألفا عن طريق التهجين مع جين مستسخ مشع من جلوبيين ألفا، وتدل الحارة الأولى على اليمسار على تهجين الـ د.ن.أ. لأشخاص مصابون بالحين الجنيني، الذين لا يوجد لديهم نسخ من جين جلوبيين ألفا، وتمثل الحارة الثانية تهجين الـ د.ن.أ. لأشخاص مصابون بمرض هيموجلوبين II، الذين لديهم نسخة واحدة من الجين؛ وتوضح الحارة الثالثة تهجين الـ د.ن.أ. لأشخاص حاملو ثالاسيميا ألفا، الذين لديهم نسختان من الجين؛ وتبين الحارة الأخيرة على اليمين، التهجين بعينات سليمة من د.ن.أ.، لأشخاص لديهم أربع نسخ من الجين.

وقد تم تشخيص ثالاسيميا ألفا بواسطة تحليل بقعة ثاوسرن ،وهى إحدى الطرق المستخدمة على نطاق واسع لتحليل الـ د.ن.أ، والتي سميت باسم مكتشفها أدوين ثاوسرن Edwin Southern من جامعة أدنبره، ويجرى هضم عينة د.ن.أ جنينية بواسطة إنزيم تقيد ،حيث يقوم بشرها عند تسلسلات نكليوتيدية محددة، ويتم فصل القطع بعد ذلك بواسطة طريقة الهجرة الكهربائية electrophoresis على دعامة من الجل، وتكتشف القطعة المحتوية على جينات ألفا-جلوبين بواسطة مجس يتكون من جين جلوبيين ألفا مشع، والقطعة التى تحتوى عادة على الجينات ستصبح غائبة إذا كان الجنين مصاب بثالاسيميا ألفا متجانسة الزيجوت (شكل ١٤-٦).



شكل ١٤-٦ تحليل بقعة ثاوسرن لعينات د.ن.أ بشرية . حارات ١،٣،٥،٦ عينات تحكم د.ن.أ، تحتوى على جينات جلوبيين ألفا سليمة. تحتوى الحارات ٢ و٤ على عينات تم الحصول عليها من مرضى بثالاسيميا ألفا متجانسة الزيجوت.

استطاع كان Kan وزملاؤه فى الآونة الأخيرة أن يطوروا طريقة فى غاية من البساطة لتشخيص ما قبل الولادة لثلاسيميا ألفا ، وتوضع بقعة من دن.أ الجنين على ورقة ترشيح،دون أن تخضع فى البداية للهضم أو الهجرة الكهربائية،ويستخدم مجس متخصص لجين جلوبيين ألفا ، ويمكن أن يميز بشكل واضح غياب جينات جلوبيين ألفا فى الأجنة مع ثلاسيميا ألفا متجانسة الزيجوت (شكل ١٤-٧)، وتستخدم هذه الطريقة على نطاق واسع فى تشخيص ما قبل الولادة لثلاسيميا ألفا فى الصين،التي ينتشر فيها هذا المرض.



شكل ١٤-٧ تحليل بقعة نقطية لـ دن.أ ثلاسيميا ألفا ، كميات متفاوتة من عينة دن.أ من رضيع مصلب بالجين الجنينى ليست لديه جينات جلوبيين ألفا تبقت فى الزوج الأعلى من المرشحات ، ويوضح مجس جلوبيين بيتا وجود هذا الجين، فى حين تكون جينات ألفا غيبة، واستخدمت نسخ عينات من السائل الأمنيوى لثلاثة أشخاص مختلفين (A و B و C) فى زوج المرشحات السفلية ، وتوضح عينات B و C وجود جينات جلوبيين ألفا وبيتا فى حين اختفت جينات جلوبيين ألفا من العينة A.

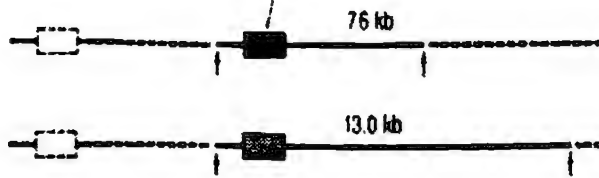
تعدد أشكال الـ د.ن.أ و تحليل الارتباط

DNA polymorphism and linkage analysis

يوضح نشوء اختبار ما قبل الولادة لمرض أنيميا الخلايا المنجلية مدى سرعة التقدم الذى حدث فى تكنولوجيا تشخيص الـ د.ن.أ. وبصفة مبدئية، لا يمكن تحديد جين الخلايا المنجلية إلا بطريقة غير مباشرة بواسطة تحليل الارتباط مع تعدد أشكال الـ د.ن.أ، والتي تعتبر تغييرات فى تسلسلات الـ د.ن.أ التى تحدث بصورة طبيعية فى الأفراد، وفى الأبحاث الجديدة ، كان الجين الطافر المرتبط بتغير معين موجود بالقرب من جين جلوبيين بيتا ولكن من الخارج، وفى غضون سنوات قليلة، تم استبدال هذه الطريقة بطريقة تحليل يمكن أن تحدد بدقة كبيرة وبصورة مباشرة الطفرة النكليوتيدية الواحدة فى د.ن.أ الجين نفسه، إلا أن تحليل الارتباط لا يزال يستخدم مع الـ د.ن.أ متعدد الأشكال فى دراسة وتشخيص العديد من الأمراض الوراثية.

وعندما استخدم كان Kan وزملاؤه إنزيم التقيد المسمى بـ HpaI لشطر عينات د.ن.أ بشرية، وجدوا أن أنماط القطع الناتجة قد تتغير من عينة لأخرى، وعلى سبيل المثال، فقد أظهر محس لجين جلوبيين بيتا أن الجين يقع عادة فى قطعة طولها ٧,٦ كيلو من القواعد، ومع ذلك، أنتج هضم إنزيم HpaI للـ د.ن.أ فى بعض الأشخاص قطعة أطول تصل ١٣ كيلو من القواعد وتحتوى على جين جلوبيين بيتا ، ونتجت القطعة الأطول من طفرة نكليوتيدية واحدة ألغت مركز الـ HpaI الأول من يمين الجين، ونتيجة لذلك، زاد طول قطعة الـ د.ن.أ بحوالى ٥ كيلو من القواعد، وهى المسافة للمركز التالى الموجود عادة لإنزيم

التقييد (شكل ١٤-٨). وتوجد قطعة الـ ١٣ كيلو من القواعد أساساً في أشخاص من أصل أفريقي، وغالباً ما ترتبط بطفرة خلية منجلية من جين جلوبيين بيتا في جماعات من الأمريكيان السود.



شكل ٨-١٤: مركز HpaI (الأسهم) التي ترتبط بجين جلوبيين بيتا الطبيعي (الخط الطوي) وجين الخلية المنجلية (الخط السفلي)، والمركز على يمين الجين الطبيعي يكون غالباً من د.ن.أ مع جين الخلية المنجلية، وكنيجة لذلك ينتج عن هضم هذا الـ د.ن.أ بواسطة إنزيم تقيد قطعة طول قواعد ١٣ كيلو بدلاً من قطعة طول قواعد ٧٠.٦ كيلو.

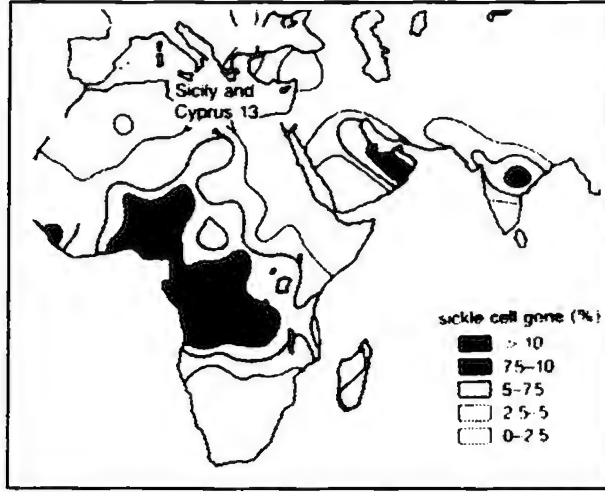
ولا يؤثر التغير في مركز الـ HpaI على وظيفة جين جلوبيين بيتا، لكنه يمكن أن يستخدم كعلامة وراثية مفيدة لطفر الخلية المنجلية، وفي بعض العائلات، يمكن أن يدل تحديد طول قطعة الـ HpaI على ما إذا كان الكرموسوم يحتوي على طفر الخلية المنجلية أم لا، ويعرف هذا النوع من تعدد أشكال الـ د.ن.أ، الذي ينشأ عنه قطع مختلفة الأطوال عندما يهضم الـ د.ن.أ بواسطة إنزيمات تقيد بـ "تعدد شكل طول قطعة التحديد" (RFLP)، وتحليل الـ RFLPs تطبيقات في العديد من الأمراض الوراثية بالإضافة إلى أنيميا الخلية المنجلية.

تطور جين الخلية المنجلية

Evolution of the sickle cell gene

دراسات الأسرة، التي يمكن أن يرتبط فيها وراثه مرض وراثي بـ RFLP معين، تعتبر من المتطلبات الأساسية لتشخيص ما قبل الولادة للمرض، وعلى سبيل المثال، لا ترتبط جميع الجينات المنجلية في أنيميا الخلية المنجلية بقطعة HpaI ذات الطول ١٣ كيلو من القواعد، ولا تحتوى كل القطع ذات الـ ١٣ كيلو من القواعد على الجين المنجلي، وقد أعطى تحليل الـ HpaI ومراكز التقييد الأخرى متعددة الأشكال في مجموعة جينات جلوبين بيتا، مفاهيم واضحة عن أصول وأنماط هجرة طفر الخلية المنجلية، ويقترح بشدة أنه حدث مرات عديدة في مجتمعات بشرية، وتوضح نتائج هذا البحث سبب ارتباط بعض طفرات جين جلوبين بيتا في الولايات المتحدة بقطعة الـ ١٣ كيلو من القواعد. ويبدو أن طفرة مركز الـ HpaI التي تسببت في ظهور قطعة الـ ١٣ كيلو من القواعد المحتوية على جين جلوبين بيتا، قد ظهرت لأول مرة في فولت العليا بغرب أفريقيا، وعقب ذلك، ظهر طفر آخر - ذلك الطفر المسبب لظهور جين الخلية المنجلية- على نفس الكروموسوم الذي كان قد احتوى على طفر الـ HpaI، ويحمي طفر الخلية المنجلية من الملاريا التي تنتشر في هذا الجزء من أفريقيا، ونتيجة لذلك، زاد تكرار حدوث قطعة الـ ١٣ كيلو قواعد مع الجين المنجلي، ولما كان لا توجد ميزة اختيارية لقطعة الـ ١٣ كيلو قواعد مع جين جلوبين بيتا العادي، فقد ظل تكرار حدوثه قليلاً، ومن ثم، ففي دول غرب أفريقيا، مثل غانا ونيجيريا، فإن معظم قطع الـ ١٣ كيلو قواعد لـ HpaI تحتوى

على جينات الخلية المنجلية، بينما لا يحمل إلا عدد قليل من القطع جين سلسلة بيتا الطبيعي (شكل ١٤-٩).



شكل ٩-١٤ التوزيع في العالم القديم لقطع التقييد ذات الـ ١٢- و الـ ٧,٦ كيلو قواعد، التي تولدت من إنزيم الـ HpaI. وقد رسم تكرار حدوث جين الخلية المنجلية.

وتشمل المناطق الأخرى التي توجد بها نسبة عالية من أنيميا الخلية المنجلية، شرق أفريقيا والسعودية والهند. ففي هذه المناطق، احتفظت الكروموسومات المحتوية على طفر الخلية المنجلية بمركز الـ HpaI الطبيعي، وتعطى قطعة الـ ٧,٦ كيلو قواعد عندما يهضمها الإنزيم. وتتضمن هذه النتيجة على أن طفر الخلية المنجلية في هذه المناطق قد نشأ بصورة مستقلة عن الطفر الذي نشأ في منطقة غرب أفريقيا.

وفى الواقع، فإن الدراسات الأخيرة التي حلل من خلالها رونالد ناجال من كلية طب أينشتاين في مدينة نيويورك والـ Dominique Labie of INSERM'S

Institut والـBiologie Cellulaires and Moleculaires فى باريس وزملاؤهـ مراكز تقيد مختلفة عديدة بالقرب من جين جلوبين بيتا ،تقترح أن الجينات فى شرق أفريقيا والسعودية والهند قد نشأت أيضا بصورة مستقلة عن بعضـ البعضـ ففى كل منطقة تستقر الجينات الطافرة على كرموسومات ذات أنماط تقيد مختلفةـ

وترتبط حوالى ٧٠% من جينات الخلية المنجلية فى المجتمع الأمريكى الأسود بقطعة الـHpaI ذات الـ ١٣ كيلو قواعد . وترتبط نسبة الـ ٣٠% الباقية بقطعة الـ ٧,٦ كيلو قواعدـ وربما يعكس هذا التوزيع حقيقة أن لمعظم الأمريكان السود أصول فى تلك المناطق من غرب أفريقيا،حيث تكون قطعة الـ ١٣ كيلو قواعد هى القطعة السائدة .

وعلى الرغم من أن تحليل الارتباط بتعدد شكل الـHpaI لا ينجح إلا مع تشخيص ما قبل الولادة لأنيميا الخلية المنجلية بنسبة تصل إلى ٧٠% من المجتمع الأمريكى الأسود،فإن استخدام تعدد الأشكال لمراكز إنزيم تقيد أخرى يزيد من نسبة الحالات الخاضعة لتشخيص ما قبل الولادةـ

تحليل مباشر لطفرة موضعية

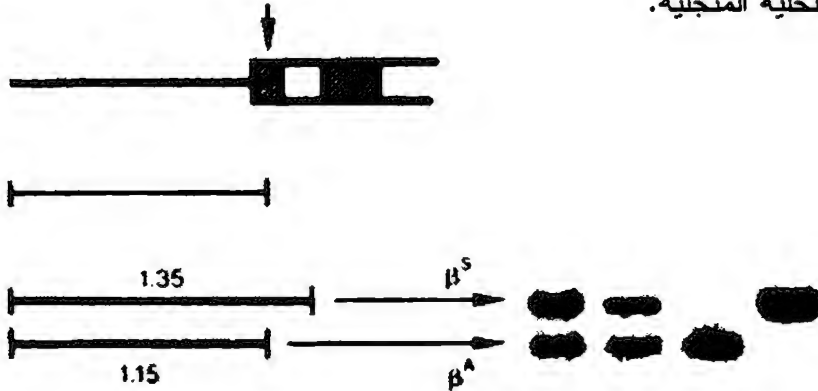
Direct analysis of a point mutation

يشطر إنزيم التقيد restriction enzyme الـ دن.أ أينما يجد تسلسلا مناظرا لمركز تعرفهـ فتسلسل الحمض الأمينى عند المواضع من ٥ إلى ٧ من جين جلوبين الطبيعى من النوع بيتا، هو برولين-حمض الجلوتاميك-حمض الجلوتاميك،الذى يشفر عنه بالتسلسل النكليوتيدي CCT-GAG-GAG. ويشق إنزيم

التقييد MstII عند تسلسل التعرف CCTNAGG، حيث تعني N أى نكليوتيد من النكليوتيدات الأربع فى الـ د.ن.أ، و سوف تقطع نتيجة لذلك جين الجلوبيين الطبيعى من نوع بيتا عند الموقع المصاب تماما بطفر الخلية المنجلية .

وينتج عن هضم الـ د.ن.أ الطبيعى بواسطة الإنزيم قطعان من هذه المنطقة :إحدهما التى تمتد ١,١٥ كيلو قواعد ناحية اليسار من مركز التعرف، والأخرى التى تمتد ٠,٢ كيلو قواعد جهة اليمين من المركز (شكل ١٤-١٠).

وسبب استبدال الفالين بحمض الجلوتاميك عند الموضع ٦ فى جلوبيين بيتا، هو تغير فى تسلسل د.ن.أ المناظر للجين لـ CCT-GTG-GAT، والذى لا يعتبر مركز انشقاق cleavage site لإنزيم MstII. وفى أنيميا الخلية المنجلية، تندمج حينئذ قطعتى الـ د.ن.أ فى قطعة طولها ١,٣٥ كيلو قواعد. وباستخدام مجس د.ن.أ مشع متخصص لموقع جين جلوبيين بيتا الذى يحتوى على موقع تعرف الـ MstII، فمن الممكن التحليل مباشرة عن وجوده أو غيابه، ومن ثم للكشف عن جين الخلية المنجلية.



شكل ١٤-١٠ الكشف للمبشر عن طفر جين الخلية المنجلية فى جين جلوبيين بيتا. عندما يفقد مركز الـ MstII، الذى يشغل كودونات ٦، ٧ من الجين، بسبب طفر الخلية المنجلية، فإن الهضم بواسطة إنزيم ينتج قطعة ١,٣٥ كيلو قواعد بدلا من القطعة الطبيعية التى طولها ١,١٥ كيلو قواعد. تحتوى الحارات المحددة بالحروف AS على عينات د.ن.أ من شخصين حاملين لجين الخلية المنجلية. ولدى هذان الشخصان كلا النوعين من القطع. والـ د.ن.أ فى الحارة المحددة بالحرفين AA هى من شخص طبيعى، الذى ليس له إلا جين جلوبيين بيتا المكتمل الطبيعى. وتحتوى الحارة المحددة بالحرفين SS على عينة د.ن.أ لمرضى بالخلية المنجلية له جين طافر ولحد فقط.

وقد حل تحليل الـ د.ن.أ بشكل تام محل عينة دم الجنين في تشخيص ما قبل الولادة لأنيميا الخلية المنجلية. وحاليا، يعتبر أسلوب الهضم بإنزيم الـ MstIII من الأساليب الشائعة الاستخدام للكشف عن طفر الخلية المنجلية، على الرغم من أنه يمكن الكشف عن الطفر بطريقة أخرى من تحليل د.ن.أ المباشر، التي تستخدم مجسات قليلة النكليوتيد لتحديد وجود أو غياب تسلسلات د.ن.أ معينة.

ثالاسيميا بيتا

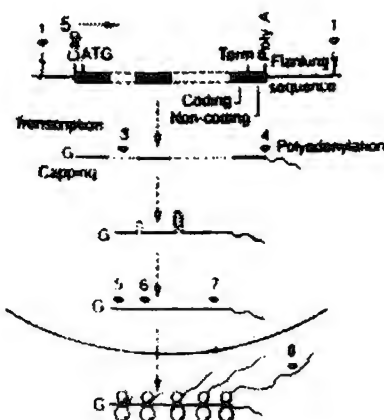
Beta- thalassaemia

يعتبر تشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا بيتا من طرق التشخيص الأكثر صعوبة من ثالاسيميا ألفا أو أنيميا الخلية المنجلية. فهناك أكثر من ٥٠ طفرا مختلفا تصيب جين جلوبين بيتا، ويتسبب عنها قصور في بروتين جلوبين بيتا، قد تم وصفها حتى الآن. والفوائد الصبغية هي السبب في نسبة تصل إلى ١٥% من هذا الطفر، غير أن الفوائد الصبغية نادرة، ولا تسبب عددا كبيرا من هذه الحالات. وتنشأ ثالاسيميا بيتا المهمة من الناحية الإكلينيكية بسبب أكثر من ٣٥ طفرا موضعيا، لا تغير سوى نكليوتيدا واحدا أو بضع نكليوتيدات.

وتقوم الطفرات الموضعية التي تم وصفها بتمزيق الوظيفة الطبيعية لجين جلوبين بيتا بطرق عديدة (شكل ١٤-١١). فالبعض منها يمزق منطقة أو أخرى من مناطق التحكم قبل بداية الجينات بالضبط تعتبر ضرورية لبدء نسخ الجين إلى ر.ن.أ الرسول، وتمنع بالتالي تخليق ر.ن.أ الرسول. بالإضافة إلى ذلك،

أحيانا ما تؤثر الطفرات على إشارة الإنهاء عند نهاية الجين، وينجم عنها إنهاء شاذ لـ ر.ن.أ الرسول، والذي يصبح نتيجة لذلك قليل المقدار.

وتمنع طفرات أخرى السير الطبيعي لـ ر.ن.أ الرسول . وتتكون جينات الجلوبيين مثل معظم جينات الكائنات الراقية الأخرى من مواقع مشفرة عن البروتين، إكسونات (exons) التي تتفصل عن بعضها بواسطة تسلسلات معترضة غير مشفرة تسمى انترونات (introns). ولجينات الجلوبيين ثلاث إكسونات واثنان من الانترونات. وينسخ كلا من الإكسونات والانترونات في ر.ن.أ الرسول، في حين تتفصل الانترونات قبل أن يتحول الـ ر.ن.أ إلى بروتين. والطفرات الموضعية الموجودة في، أو بالقرب من جهة تسلسل معترض قد تجعله يصنع بطريقة شاذة. وتكون النتيجة نقص في تخليق جلوبيين بيتا، حيث تكون جزيئات ر.ن.أ الرسول المصنعة بطريقة شاذة في الغالب غير مستقرة وعادة ما تكون غير فعالة.



شكل ١١-١٤ أنواع الطفرات المختلفة التي قد تمزق تعبير جين الجلوبيين، وتسبب الإصابة بالاسيميا بيتا. ويوضح الخط العلوي تنظيم جين جلوبيين بيتا مع الإكسونات المشفرة عن البروتين باللون الأسود، وتمثل الانترونات غير المشفرة بالخطوط المتقطعة. الفواصل الصغرى (١) يمكن أن تزيل جزء من الجين أو كله ولكنها ليست شائعة. وتصيب الطفرات المهمة من الناحية الإكلينيكية واحدا أو بضعة نكليوتيدات فقط. وإذا وجدت هذه النكليوتيدات في الموضع (٢)، وهو منطقة التحكم القريبة من بداية الجين فلتها يمكن أن تمنع النسخ إلى ر.ن.أ الرسول. والطفرات في الانترونات (٣) أو في نيل polyA (٤) يمكن أن تعرض تخليق جلوبيين بيتا عن طريق منع السير الطبيعي لـ ر.ن.أ الرسول. والطفرات التي توقف تحول الرسول المصنع إلى بروتين تشمل على تغيرات في كودون (٥) والطفرات عديمة المعنى والمحركة للأطوار (٦) تحول كودونات الإنهاء في منطقة التشفير. والطفرات في كودون الإنهاء الطبيعي (٧) يمكن أن توقف التحول أيضا. وأخيرا تؤدي بعض الطفرات إلى إنتاج جلوبيين غير ثابت (٨) الذي يدمر بطريقة مبكرة.

وتتدخل العديد من الطفرات الموضعية أيضا في تحويل ر.ن.أ الرسول لجلوبين بيتا إلى بروتين، حيث يمكن أن تؤثر الطفرات الموجودة في كودون (codon) البدء على بداية التحويل . وقد تغير طفرات التسلسل المشفر كودون حمضا أمينيا طبيعيا إلى كودون توقف (stop codon)، ونتيجة لذلك تسبب إنهاء مبسر لتخليق السلسلة. وقد تضيف أو تلغى الطفرات الموضعية الأخرى نكليوتيدات، وتنتقل إطار القراءة من موضعه، ونتيجة لذلك تغير كل الكودونات بعد الطفر. ولا تنتج أى من جينات جلوبين بيتا ذات الطفرات الانتقالية بروتينات وظيفية .

وأخيرا، تنتج بعض الطفرات هيملوجلوبينات تكون غير مستقرة تماما، بسبب استبدال الحمض الأميني في مناطق مؤثرة من سلسلة جلوبين بيتا.

ولا يوجد سوى بضعة طفرات موضعية في ثالاسيميا بيتا، يتصادف أن تخلق مركز تقييد جديد أو تلغى مركزا موجودا، وبذلك يمكن الكشف عنها بواسطة تحليل إنزيم التقييد.

وهناك طريقتان متاحتان للكشف عن بقية الطفرات الموضعية. الطريقة الأولى، طريقة غير مباشرة تعتمد على ارتباط الطفر بمراكز التقييد متعدد الأشكال. والطريقة الثانية، التهجين بقليلات النكليوتيد oligonucleotides، التي ترتبط بطريقة خاصة بالجين في منطقة الطفر.

مراكز تقييد متعددة الأشكال مع مجموعة جين جلوبيين بيتا

Polymorphic restriction sites along the beta-globin gene cluster

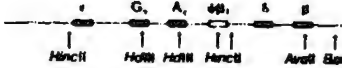
يعتبر جين جلوبيين بيتا أحد أفراد عائلة جينات مرتبطة ببعضها تقع في مجموعة على الكرموسوم ١١. وتشمل العائلة جينات أوسيلون، وجاما، جلوبيين وجين جلوبيين بيتا الكاذب غير النشط، وجينات جلوبيين دلتا، بالإضافة إلى جين جلوبيين بيتا.

ومنذ اكتشاف الـ HpaI متعدد الشكل، فقد وجد أن حوالي عشرون مركز تقييد آخر في مجموعة جين جلوبيين بيتا مراكز متعددة الأشكال، أي أنها موجودة في بعض الأشخاص ولا توجد في أشخاص آخرين. ويمكن الكشف عن المراكز متعددة الأشكال المختلفة باستخدام مجسات للجينات العديدة الواقعة في المجموعة. وبإجراء تحليل للكشف عن وجود هذه المراكز على كرموسوم معين، فإنه يمكن إنشاء نموذج، وتصنيف الكروموسومات إلى أنماط فردانية haplotypes، تبعا لنماذجها.

وقد أوضحت دراسات مفصلة عن مرضى ثلاسيميا بيتا الإيطاليين وعائلاتهم، أن تسعة أنماط معينة تحدث بصورة شائعة في هذا المجتمع (شكل ١٤-١٢). ويصبح كل طفر من الطفرات المختلفة لثلاسيميا بيتا مرتبطا بنمط فرداني من الكرموسوم الذي نشأ منه. وبطبيعة الحال، يمكن أن يكون للكرموسومات التي لها نفس النمط الفردي أكثر من طفر واحد. وبالعكس، يمكن أن يرتبط الطفر نفسه بأكثر من نمط فرداني، إما لأن الطفر يحدث أكثر من

مرة، أو لأن كرموسومين تبادلا مادتهما الجينية. ونتيجة لذلك، فإن معرفة النمط الفردي لكروموسوم معين لا يشير بالتحديد إلى وجود طفر ثالاسيميا بيتا معين.

وعلى الرغم من ذلك، ففي إحدى العائلات، تعتبر مراكز التقييد متعددة الأشكال مستعدة للعمل كعلامات markers، لتدل على أى الكروموسومات التى تحتوى على جين جلوبيين بيتا شاذ. وعند اختيار مراكز تحديد استراتيجية، فإن واحداً أو اثنين من إنزيمات التقييد ستصبح كافية عادة لتعليم الكروموسومات، والتعرف على إنزيمات التحديد التى تحتوى كروموسوماتها على الجينات الطبيعية والطافرة، فى عائلة تعرف بأنها تتعرض لخطر مرض وراثي. ويمكن استخدام هذا الأسلوب بنجاح لتشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا بيتا فى العائلات التى حدث أن تم فيها إنشاء ارتباط بين نمط معين وطفرة. ومع ذلك، فإن هذه الدراسات العائلية مجهدة ومضيفة للوقت، وربما تكون مستحيلة إذا لم يتوفر أفراد العائلة الذين يكونون متجانسو الزيجوت بالنسبة للجين الطافر.

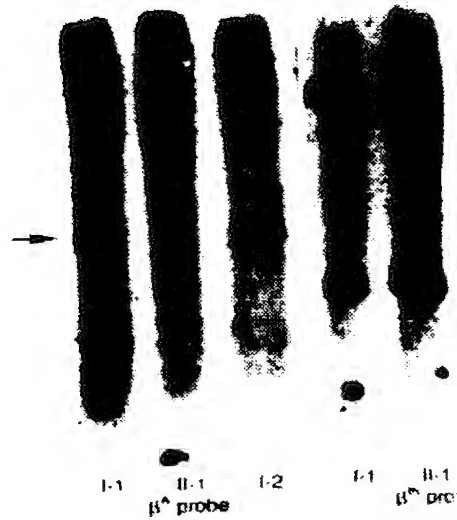
							(%)
I	+	-	-	-	+	+	47
II	-	+	+	+	+	+	17
III	-	+	-	+	+	-	8
IV	-	+	-	+	-	+	1
V	+	-	-	-	+	-	12
VI	-	+	+	-	-	+	6
VII	+	-	-	-	-	+	6
VIII	-	+	-	+	+	-	1
IX	-	+	+	+	+	+	3

شكل ١٢-١٤ مجموعة جين جلوبيين بيتا. توضح الأسهم مواضع سبعة مراكز تقييد متعددة الأشكال. و تم التعرف على إنزيم التقييد لكل مركز أسفل السهم. وموضح أنماط وتكرارات تسعة من الأنماط الفردية التى وجدت فى المجتمع الإيطالي. وتدل علامات + على المواقع الموجودة، وتدل علامات - على المواقع الغائبة لكل نمط فردي.

تحليل مباشر بمجسات قليلة النكليوتيد

Direct analysis with oligonucleotide probes

وهناك وسيلة أكثر دقة لتحليل الطفرات الموضعية في ثالاسيميا بيتا تكون بواسطة مجسات قليلة النكليوتيد-وهي تسلسلات د.ن.أ. تحتوى عادة نحو ١٨ إلى ٢٠ نكليوتيدا، وتوائم للارتباط مع أى تسلسل مستهدف مرغوب فى مجموعة العوامل الوراثية. ولكى نفحص طفرا موضعيا، فإنه يجرى تخليق زوج من المجسات المشعة ، يناظر أحدهما التسلسل الطبيعى ويناظر الآخر التسلسل المطفر. ويجرى تهجين المجسين لاختبار الـ د.ن.أ. على بقع ثاوسرن Southern blots مستقلة . وفى ظل ظروف محكمة بصورة ملائمة، فإن المجس الطبيعى لن يهجن إلا مع د.ن.أ. طبيعى، ولن يهجن المجس الطافر إلا مع د.ن.أ. ثالاسيمى (شكل ١٤-١٣). ويمكن أن يميز هذا الأسلوب تماما الأشخاص الطبيعىون الذين لهم جينين غير مصابين عن الأشخاص الحاملين الذين لهم جينا واحدا طبيعيا وجينا آخر طاфра، والأشخاص المرضى الذين لهم جينان طافران. وقد استخدم هذا الأسلوب بطريقة ناجحة جدا مع ثالاسيميا بيتا والأمراض الوراثية الأخرى.



شكل ١٤-١٣ تحليل مجس قليل النكليوتيد لطفر ثالاسيميا بيتا. تحول الطفرة الكونون التسع والثلاثين من جين جلوبيين بيتا من CAG إلى TAG، وبالتالي يغير كودون جلوتامين إلى كودون توقف. وينتشر هذا الطفر في إيطاليا. ويكشف مجس قليل النكليوتيد β^A عن تسلسل جين جلوبيين بيتا الطبيعي، ويكشف β^{th} عن التسلسل الطفر. وفي العائلة المختبرة فإن الأبناء (١-٢ و ١-١) يعتبران متغيرا الزيجوت بالنسبة للطفر. ويهجن دن. أ. الخاص بهما مع كلا المجسين. ويهجن دن. أ. من طفلهما (II-١) الذي يعتبر متجسس الزيجوت بالنسبة للطفر مع المجس الطفر فقط.

وتبدو مهمة اختيار المجس المناسب لعائلة معينة مهددة بالمرض من المهام الصعبة، لأن العديد جدا من الطفرات الموضعية تسبب ثالاسيميا بيتا، وتحتاج كل طفرة إلى زوجها الفريد من المجسات قليلة النكليوتيد. ومع ذلك، تدل دراسات حديثة لثالاسيميا بيتا في إيطاليا على أنه على الرغم من وجود العديد من الطفرات المختلفة في مجتمع، فالبعض منها فقط هو الذي يحدث بصورة متكررة. وتسبب ثلاث طفرات من الطفرات التسع التي درست في إيطاليا أكثر من ٨٠% من آفات ثالاسيميا بيتا.

وعلاوة على ذلك، فإن للطفرات توزيعات جغرافية متميزة. فاثنتان من الطفرات يسودان منطقة فيرارا على سبيل المثال، في حين تسبب إحدى الطفرات

٩٥% من الآفات فى جزيرة سردينيا. ونتيجة لذلك، فإذا كانت المنطقة الإيطالية التى نشأ بها مريض العائلة معروفة، فإنه يمكن اختيار مجسات ملائمة لاختبار طفر ثالاسيميا بيتا.

اضطرابات وراثية أخرى

Other genetic disorders

يوجد حوالى ٣٠٠٠ مرض وراثى تنشأ بسبب طفرات تؤثر على جينات فردية، حيث تصيب الجينات المعيبة التى تحمل على كروموسوم X، الذكور بصفة أساسية، الذين لديهم كروموسوم X واحدا فقط. فالذكور لديهم فرصة ٥٠% لوراثة جين طافر من أنثى حاملة له، ويطورون المرض المشكوك فيه. وللإناث كروموسومان من نوع X، ويجب أن تكون لديهن جينا معيبا فى كلا الكروموسومان حتى تظهر أعراض المرض. ومرض الهيموفيليا، وهو المرض الذى لا يتجلط فيه الدم بصورة طبيعية هو مثلا لارتباط المرض بكروموسوم X هذا.

والاضطرابات الوراثية التى تنشأ بسبب الجينات المحمولة على الصبغيات الجسدية autosomes، أى على الكروموسومات الأخرى غير كروموسومات الجنس، إما أن تكون اضطرابات متنحية أو سائدة. فالأمراض الصبغية الجسدية السائدة تكون واضحة، عندما يكون جين واحد فقط من الجينان مصابا بمرض هنتينجتون (والذى يسمى أيضا بكوريا هنتينجتون) مثال واضحا لهذه الحالة. فالاضطرابات الصبغية الجسدية المتنحية، التى تضم معظم الأمراض الوراثية، لا تعتبر أعراض مرض عادة إلا عندما تصاب كلا نسختي الجين. وفى خلال

الخمسة سنوات الماضية كشف تحليل الـ د.ن.أ عن الجينات المصابة بأعداد متزايدة في هذه الأمراض.

وفي الأمراض التي تم فيها تحديد منتج الجينات المصابة، فإن طريقة التحليل بالـ د.ن.أ تكون مشابهة للطريقة المستخدمة في تحليل جينات الجلوبيين. ويجرى عزل جين الـ د.ن.أ، وإذا كان الطفر المسبب لإصابة الجين لم يتم تصويره بدقة بعد، فيستخدم كمجس تهجين للكشف عن الجين الشاذ من خلال الارتباط بمواقع التقييد متعددة الأشكال. وإذا كانت الآفات الجينية معروفة، فيمكن القيام بالكشف المباشر بإنزيمات التقييد أو المجسات قليلة النكليوتيد. وإذا كان منتج الجينات المصابة غير معروف، كما في حالة مرض هنتجتون وتليف البنكرياس الحوصلي cystic fibrosis، فتقتضى الاستراتيجية استخدام قطع من الـ د.ن.أ البشرى كمجسات للبحث عن ارتباطات للجين الطافر.

الأمراض التي تكون فيها نواتج الجين الشاذ معروفة

Diseases in which abnormal gene products are known

مرض الخلل الأيضى الوراثي Phenylketonuria، مرض صبغى جسمى متنحى، ينشأ في معظم الأحوال نتيجة عيب في إنزيم فنيل ألانين هيدروكسيلاز phenylalanine hydroxylase، الذى يحول الحمض الأمينى فنيل ألانين phenylalanine إلى حمض تيروسين tyrosine. وكنتيجة لضعف نشاط الإنزيم، تتراكم تركيزات عالية من الفينيل ألانين في الدم والأنسجة الأخرى. وتسبب تركيزات الفينا ألانين تأثيرات ضارة على نمو المخ. ولا تظهر تأثيرات

المرض عند الولادة، ولكن بمجرد أن يبدأ الوليد في تناول غذاء غنى بالفينيل ألانين -مثل اللبن- تظهر أعراض المرض بصورة واضحة. وعندما تترك هذه الأعراض بدون علاج، فسيكون لدى ٩٨% من المرضى حاصلات ذكاء IQs أقل من ٧٠ (ويعتبر حاصل الذكاء ١٠٠، هو الحاصل المتوسط بالنسبة لمجتمع). وتشمل الظواهر الأخرى لخلل الأيض الوراثي على التشنجات convulsions وسلوك ذهاني psychotic behaviour وإكزيما eczema ونقص في تصبغ البشرة.

ويمكن الكشف عن الحالة بسهولة عند الولادة بسبب التركيزات العالية للفينيل ألانين التي تظهر في البول. ويكون العلاج الحالي من إبقاء الطفل المصاب على وجبة غذائية تحتوي على القليل من هذا الحمض الأميني. وتعتبر المراقبة الواعية لفينيل ألانين الدم أمراً ضرورياً، حيث تكون لتركيزات الفينيل ألانين المنخفضة نفس خطورة التركيزات العالية، ويمكن أن تؤدي المستويات المنخفضة غير العادية من الحمض الأميني إلى نمو ضعيف، وتأخر نمو العظام، وتضخم في الكبد، وعدوى، ومستوى منخفض من السكر في الدم، واضطرابات عصبية.

والمرضون الذين يلتزمون بنظام غذائي صارم، سينمون بصورة طبيعية، بالرغم من أن حاصل ذكاؤهم سيكون عند حده الأدنى من حاصل الذكاء المتوسط. ويعد إبقاء الطفل على وجبة غذائية ذات محتوى فنيل ألانين منخفض من الأمور الصعبة، لأنه يجب في هذه الحالة تجنب العديد من الأطعمة الشعبية. وحتى عندما يعالج، فيمكن أن يفرض المرض نتيجة لذلك مشاكل نفسية وسلوكية (عدم لباقة وحسن تصرف).

واستطاع مؤخرا سافيو وو Savio Woo وزملاؤه فى كلية طب بايلور فى هيوستون بولاية تكساس أن يستنسخوا جينا للفنيل هيدروكسيلاز phenylalanine hydroxylase. ويبلغ طول الـ د.ن.أ. المستسخ الذى يعتبر نسخة من ر.ن.أ. الرسول المناظر ٣ كيلو قواعد تقريبا. ويشغل تسلسل مجموعة العوامل الوراثية كله حوالى ١٠٠ كيلو قواعد من الـ د.ن.أ. ولما كان الجين كبيرا جدا، فإنه يحتوى على العديد من مراكز التقييد متعددة الأشكال. وتعمل هذه المراكز كعلامات لتحليل الارتباط للتعرف على حامل المرض، وكشف لما قبل الولادة عن قصور الفنيل ألانين هيدروكسيلاز phenylalanine hydroxylase. وقد بدء فى فهم الطفرات التى تسبب خلل الأيض الوراثى، إذ وتوضح النتائج حتى الآن، أن طفرات قليلة فقط هى التى تسبب هذا الاضطراب، على الأقل فى شمال أوروبا. وبمجرد أن يتم تحديد هذه الطفرات، فسيصبح من الممكن الكشف المباشر بواسطة قليلات نكليوتيد أو إنزيمات تقييد معينة .

وهناك مرض وراثى آخر معروف عييه البروتينى، هو نقص ألفا-١- أنتيريسبين alpha-١-antitrypsin. ويعتبر هذا المرض الكابح الرئيسى للجسم، أو إنزيمات البروتياز التى تهدم البروتينات. والمرض متغير تماما فى حدته، غير أن الأشخاص المصابين به يعانون من تلف بالكبد، لأن كابح البروتياز لا يمكنه أن يفرز من الكبد، ويعانون من أمفزيما emphysema، لأن الـ alpha-١-antitrypsin هو الكابح الرئيسى لإنزيم الاستاز elastase، الذى يشطر البروتين فى الجهاز التنفسي respiratory tract. وكنتيجة للنشاط الزائد لإنزيم الاستاز تعاني الرئتان من تلف واضح بسبب الأمفزيما.

ويعتبر بروتين α_1 -antitrypsin متعدد الأشكال بصورة غير عادية فقد تم تمييز ما يزيد عن ثلاثين نوعا متغيرا منه حتى الآن. وأهم هذه الأنواع هو نوع Z، الذى ينشأ نتيجة تطفر حمض الجلوتاميك إلى حمض ليسين lysine عند موضع الحمض الأميني ١٥٣. ويمكن حاليا التمييز بين جين Z والجين الطبيعي M، عن طريق التهجين مع مجسات تخليقية قليلة النكليوتيد، وقد استتبعت مجموعة وطريقة ناجحة لتشخيص ما قبل الولادة لنقص α_1 -antitrypsin.

ومن أشهر اضطرابات النزيف الوراثي، اضطرابات الهيموفيليا haemophilias disorders، حيث يتسبب عن الهيموفيليا A، التى تحدث نتيجة نقص معامل التجلط VIII ٩٠% من الحالات، وتسبب الهيموفيليا B، والتى تحدث نتيجة نقص فى معامل التجلط IX، الحالات العشرة الباقية. وتختلف درجة النزيف التى يعانى منها المرضى تبعا لكمية معامل التجلط الموجود فى الدم. ويحتاج بعض المرضى إلى عمليات إدخال معامل VIII أو معامل IX، ملاحقًا بتركيزات كافية منه لمنع النزيف. ولا يعانى البعض الآخر من نقص حاد و يحتاجون عمليات إدخال بكميات أقل من هذين المعاملين.

ويعتبر نوعا الهيموفيليا من الاضطرابات المرتبطة بالجنس، حيث تقع جيناتها على الذراع الطويل من كروموسوم X. وتكون لدى الأنثى الحاملة للمرض، فرصة ٥٠% لأن تتجب ابنا مصابا بالمرض، وفرصة ٥٠% أيضا لإنجاب ابنة حاملة للمرض. والطفرات التلقائية-وهى تلك الطفرات التى تظهر فى عائلة ليس لها تاريخ إصابة بالمرض-قد تم بحثها أيضا. ويبدو أن الملكة

فيكتوريا ٢ على سبيل المثال، كانت تحمل هذا الطفر التلقائي. فقد أصيب الأمير ليوبولد أصغر أبنائها الأربعة بالهيموفيليا، وكانت اثنتان من بناتها أليس وباتريشيا حاملتين للمرض. وتزوجت ابنتها أليس قيصر روسيا نيقولا الثاني وأصبحت الإمبراطورة ألكسندرا. وظهرت على ابنهما ألكسيس أعراض الهيموفيليا، وهي الحالة التي ساعدت على انهيار الأسرة الملكية الروسية في ثورة عام ١٩١٧.

وقامت مجموعتان من الباحثين، إحداهما من شركة جينتك في جنوب سان فرانسيسكو وأخرى من معهد جينتك في بوسطن بولاية ماساشوتس باستتساخ جين لمعامل VIII. وقام جورج برونلي من جامعة إكسفورد بإنجلترا وإيرل ديفيز من جامعة واشنطن في سياتل وزملاؤهما باستتساخ جين لمعامل IX. وتؤثر العديد من الطفرات التي تشمل كلا من الطفرات الموضعية، والإلغاء الكامل أو الجزئي على وظائف الجينان. بالإضافة إلى ذلك، فقد تم التعرف على العيوب التي تمنع الوصل الطبيعي لـ ر.ن.أ الرسول بمعامل IX.

تؤثر العديد من طفرات جين المعامل VIII على مراكز تعرف التقييد، ويمكن الكشف عنها بالتحليل الإنزيمي المباشر. ويوجد أيضا عددا من المراكز متعددة الأشكال داخل وحول جينات معامل التجلط التي يمكن استخدامها في افتقاء أثار الهيموفيليا، في حالات لا يمكن فيها الكشف المباشر عن الطفر. فالمجس المصنوع من قطعة د.ن.أ عشوائية، يكشف عن مركز على درجة كبيرة من

^٢ الملكة فيكتوريا (١٨١٩-١٩٠١): ملكة بريطانيا العظمى (١٨٣٧-١٩٠١) وإمبراطورة الهند (١٨٧٦-١٩٠١).

(١٩٠١). اتسعت في عهدها رقعة الامبراطورية البريطانية. المترجم

التعدد الشكلي، ويرتبط ارتباطا وثيقا بجين معامل VIII، ويمكن استخدامه لتحليل ارتباط هيموفيليا A.

ويمكن استخدام مجسات الـ د.ن.أ أيضا للكشف عن حامل المرض. فعلى الرغم من إمكانية تشخيص مريض الهيموفيليا بسهولة عن طريق قياس مستوى نشاط معامل VIII أو IX في بلازما دمه، إلا أن تحديد الإناث الحاملة لجين الهيموفيليا يعد من الأمور الصعبة. فمتوسط تركيزات معدل تجلطهن ٥٠% من الطبيعي، لكنها تظهر تغيرية كافية تخيم على التحديد الإيجابي لبعض المرضى. ويمكن أن تحدد علامات الـ د.ن.أ أي الكروموسومات التي تحمل الجين الشاذ، وبذلك يمكن تحديد الإناث الحاملة للمرض.

أمراض ذات مواقع جينية غير محددة

Diseases with undefined genetic loci

العيوب البروتينية التي تتضمنها الاضطرابات الوراثية العديدة غير معروفة، على الرغم من أن الحالات تسبب أعراضا معروفة إكلينيكيًا. فحتى الكروموسومات التي تقع عليها الجينات المعيبة، تكون في غالب الأحوال غير محددة، إلا إذا كان يضع نمط وراثه المرض الجين على الكروموسوم X. وقد يمكن أيضا تمييز الموقع الكروموسومي، إذا حدثت الأعراض الإكلينيكية في مرضى حذف منهم بعض قطع كروموسومية معينة، ففي تلك الحالة يمكن استنتاج أن الجين المعيب يقع على القطعة الملقاة.

ويقدم تحليل الـ د.ن.أ طريقة تعرف على الجينات المعيبة في تلك الأمراض الوراثية، التي لا يوجد عنها أية معلومات عن العيب الكيميائي الحيوي.

فبعض تسلسلات الـ د.ن.أ تظهر مرة واحدة فقط فى مجموعة العوامل الوراثية البشرية، فى حين تتكرر التسلسلات الأخرى مئات أو آلاف المرات. ولدراسة الأمراض المشتمة على منتجات بروتينية غير معروفة، تستخدم تسلسلات وحيدة فردية أولا فى التعرف على مراكز التقييد التى تظهر تعدد الأشكال. وهذا التسلسل يمكن أن يستخدم بعد ذلك فى فحص الـ د.ن.أ أفراد من مجتمع مصابون بالمرض الوراثى، للتعرف على ما إذا كان هناك متغير معين للمركز متعدد الأشكال موروثا مع المرض. فإذا وجد هذا الارتباط، يفترض حينئذ أن جين المرض والمركز متعدد الأشكال بالقرب من بعضهما البعض على نفس الكروموسوم. ويمكن الكشف عن هوية هذا الكروموسوم بعد ذلك بأى طريقة من الطرق العديدة.

والأشخاص المصابون بمرض هنتينجتون يكونون أصحاء حتى سن الأربعين. وفى هذه السن تسبب التغيرات الهدامة فى الجهاز العصبى المركزى حركات غير متناسقة ولا إرادية. ومع تقدم المرض يصبح المرضى موهنين جسمانيا وعقلياً، وعادة ما يتوفون فى غضون سنوات قليلة من بدء ظهور الأعراض.

يكون لدى أطفال مريض مصاب بمرض هنتينجتون فرصة ٥٠% لأن يرثوا الجين. ولما كان الجين من النوع الصبغى الجسدى السائد، فكل من يرث المرض سيظهره. وكان لا يمكن من قبل تحديد الذين يرثون مرض هنتينجتون إلى أن تتطور الأعراض، غير أن جيمس جوسيللا James Gusella من مدرسة الطب بهارفارد وزملاؤه استطاعوا أخيراً تمييز علامة لمرض هنتينجتون. وقد قاموا بهذا بواسطة العديد من مجسات د.ن.أ العشوائية لدراسة قبيلة فنزويلية مصابة

بهذا المرض. ونجح أحد المجسات فى تحديد مركزاً متعدد الأشكال مرتبط تماماً بالمرض وحدد بعد ذلك مركزه عند طرف كرموسوم ٤. ولا تزال تبذل الجهود لتحديد الجين نفسه.

ويعتبر الحثل العضلى دشين Duchenne muscular dystrophy، الصورة الشهيرة من صور الحثل العضلى. ويعانون الذكور المصابون بالمرض من الضعف الناتج عن الانحلال العضلى التدريجى، الذى يبدأ فى الرحم ويستمر لما بعد الولادة. وتلاحظ دلائل المرض فى البداية بضعف فى عضلات الأطراف، لكنها تتقدم لتشمل كل العضلات بما فيها عضلة القلب. وغالباً ما يتوفى الأفراد المصابون بالمرض أثناء مرحلة الطفولة.

وتحدث لبعض مرضى الحثل العضلى دشين Duchenne muscular dystrophy تغييرات فى أوضاع الذراع القصير لكرموسوم X، ويحتمل أن يقع الجين العيب فى هذه المنطقة. وتركز اهتمام العديد من المجموعات البحثية على هذه المنطقة الكروموسومية، وأوجدت مجساً لمركز قريب جداً من جين الـ Duchenne muscular dystrophy. وقد ساعد المجس الباحثون فى اقتفاء أثر وراثته المرض بنسبة يقين بلغت ٩٥% من الحالات.

ويعتبر تليف البنكرياس الحوصلى Cystic fibrosis من الاضطرابات الصبغية الجسدية المتنحية الشهيرة، التى تحدث بنسبة ١ فى ٢٠٠٠ من الولادات الحية فى المجتمع القوقازى. ولا تظهر على حاملى الجين المعيب أية أعراض، فى حين يصاب الأشخاص الذين يرثون نسختين من الجين بإعياء شديد، وتقرز غدد الإفراز secretory glands مخاطاً سميكاً. وعندما يتراكم هذا المخاط فى الشعب الهوائية bronchial tubes للرئتين، ينشأ عنه مرض رئوى عائق مزمن وعدوى

متكررة. ويكون إفراز البنكرياس أيضا إفرازا شاذًا، وتكون النتيجة عدم هضم الطعام بصورة سليمة ويمتص من الأمعاء. ويعانى الأشخاص المصابون بالمرض من تليّف فى الكبد، وغالبا ما يكون الذكور عديمى الخصوبة. وتفرز غدد العرق sweat glands تركيزات عالية بصورة شاذة من كلوريد الصوديوم، الذى يمكن أن يستخدم كاختبار تشخيصى للمرض. وفترة الإصابة بتليّف البنكرياس الحوصلى والتكهن بما سيتطور إليه المرض متغيرة، وتتوقف على مدى شدة الإصابة التى تأثرت بها الرئتين.

واستخدم لاب تشى تسو Lap Chi من جامعة ترنتو بكندا، وروبرت ويليامز Robert William من مستشفى سانت مارى بلندن، مجسات عشوائية من د.ن.أ للبحث عن المحل الجينى لتليّف البنكرياس الحوصلى. واكتشفوا مجسات د.ن.أ تتعرف على مراكز قريبة من الجين، الذين تم تحديد موقعه على الذراع الطويل لكرموسوم ٧. ويرتبط اثنان من المواقع ارتباطا وثيقا بالجين، لدرجة أن هذا المرض يمكن تتبع أثره بمستوى ثقة أكبر من ٩٥%. ويجرى استخدام المجسات بصورة ناجحة للكشف عن حاملى المرض وتشخيص ما قبل الولادة.

موضوعات أخلاقية أثارها تشخيص ما قبل الولادة

Ethical issues raised by prenatal diagnosis

يعتبر عدد الأمراض الوراثية الخاضعة للكشف بتكنولوجيا الـ د.ن.أ الجديدة فى تزايد مستمر، فقد أصبح من الممكن إجراء تشخيص ما قبل الولادة للأمراض التى لم يكن من غير المستطاع من قبل الكشف عنها قبل الولادة، وأتاحت التعرف على حاملى الجينات المصابة. وبلا شك، فقد أفادت هذه

التطورات الحديثة الأعداد المتزايدة من الأسر التى كانت تتأثر بالأمراض الوراثية.

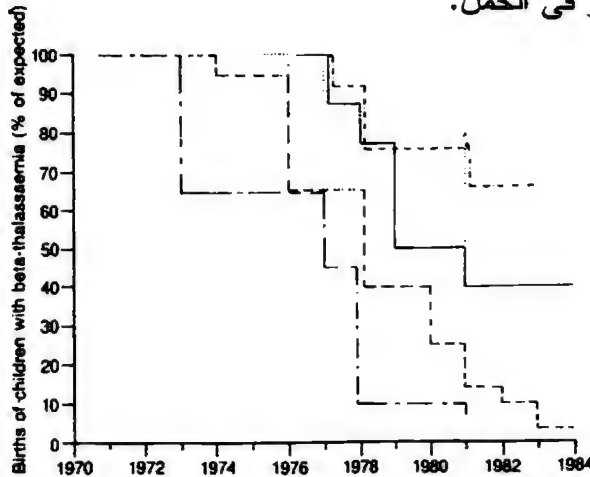
وعلى الرغم من ذلك، فغالبا ما يثير التقدم العلمى أسئلة، وقد نشأت العديد من الموضوعات الأخلاقية المهمة كنتيجة لتوفر اختبارات ما قبل الولادة. ولما كانت طرق العلاج غير متوفرة لمعظم الاضطرابات الوراثية، فإن تحديد جنين مصاب يعطى الأبوين أساسا خيار لإنهاء الحمل. وسواء أكان هذا الأمر يجد له ما يبرره لكل مرض وراثى، فإنه يعتبر من الموضوعات التى يخاض فيها الجدل العنيف. وأحيانا ما تكون الخيارات واضحة تماما، فمن المحتم أن يتوفى الجنين المصاب بثلاسيميا ألفا إما قبل أو عند الولادة. وقد وفر الإجهاض المبكر للحمل على الأم عشرون أسبوعا من الحمل، بالإضافة إلى التعقيدات الناجمة من تسمم الدم، وفترة المخاض الصعبة ونزيف ما بعد الولادة.

ومكن العلاج الحالى لمرضى ثلاسيميا بيتا متجانس الزيجوت بالحقن اليومى بالديسفر وكسامين وعمليات نقل الدم كل شهر من أن يعيشوا حياة طبيعية أو شبه طبيعية. وعلى الرغم من ذلك، فإنه لا يمكن تقييم أبعاد العلاج على المدى الطويل حتى الآن، حيث بدء فى تعاطى هذا العلاج منذ السبعينيات. وعلاوة على ذلك، يفرض نظام العلاج أعباء على المريض وأسرته. حيث تشكل تكلفة العلاج المرتفعة التى تصل إلى ٥٠٠٠٠ دولار فى العام عبء كبير على أسرة المريض وعلى اقتصاد الدول النامية التى ينتشر فيها المرض.

وقد أثر توفر تشخيص ما قبل الولادة والإجهاض الاختيارى على الأنماط الإنجابية للأشخاص حاملى جين ثلاسيميا بيتا، فالعديد من هؤلاء الأشخاص

الذين شاهدوا بالفعل معاناة طفل مصاب، ولم يكن لهم أطفال من قبل، يفضلون الآن تجنب هذه المعاناة لأبنائهم. ففي إيطاليا واليونان وقبرص، تناقصت أعداد الولادات المصابة بالتجناس الزيجوتي إلى حد كبير أو ربما تكون انتهت تماماً (شكل ١٤-١٤).

وكان لتشخيص ما قبل الولادة لأنيميا الخلية المنجلية درجة قبول مختلطة، ويرجع ذلك أساساً لتقلب دور المرض الإكلينيكي، حيث يمكن لمعظم مرضى أنيميا الخلية المنجلية توقع حدوث بعض الأعراض، في حين تكون أعراض مرض بعض الأفراد أشد من البعض الآخر. والسبب الذي يجعل المرضى يكون لهم هذه التكهات المتقلبة عن المرض غير معروف تماماً، ومن المستحيل توقع ما إذا كان الشخص المصاب ستظهر عليه أعراض المرض الإكلينيكية الشديدة. وتوضح الخبرة الأولية مع تشخيص ما قبل الولادة، أن حوالى نصف الآباء يختارون إجهاض الجنين المصاب، بينما يفضل النصف الآخر الاستمرار في الحمل.



شكل ١٤-١٤ تناقص أعداد الأطفال المولودين بثلاسيميا بيتا متجانسة الزيجوت في بعض الدول منذ إدخال تشخيص ما قبل الولادة.

وأثار توفر تشخيص ما قبل الولادة لخلل الأيض الوراثي موضوعاً آخر، ويمكن تشخيص هذا الاضطراب عند الولادة بواسطة اختبار بسيط للدم. فإذا اتبع الطفل المصاب وجبة صارمة أثناء فترة الرضاعة والطفولة، فيمكنه تجنب العديد من مضاعفات المرض. ومع ذلك، يحدث لبعض الأطفال الذين يصابون بالمرض تلف متخلف بالمخ، ويعانى بعض المرضى من مشاكل نفسية وسلوكية شديدة، بسبب النظام الغذائي الصارم الذى يفرض عليهم اتباعه. ونتيجة لذلك، لا يزال يفضل بعض الآباء إجراء تشخيص ما قبل الولادة والإجهاض الاختيارى.

وتبرز القدرة على تحديد هؤلاء الذين ورثوا جينا فى حالات مثل مرض هنتينجتون مجموعة مشاكل مختلفة. فقد تمكنت مجسات الـ د.ن.أ من تحديد هذا المرض، منذ سنوات عديدة قبل أن يستفحل. ولما كانت لا توجد طرق علاجية لتغيير خط سير المرض، فإن تحديد هؤلاء الأشخاص المصابين فى فترة مبكرة من العمر، قد يشكل عليهم أعباء نفسية ضخمة. إلا أنه يساعدهم أيضا على اتخاذ قرار مدروس، فيما إذا كانوا يرغبون فى إنجاب طفل، ويخاطرون بنقل الجين إلى ذرية أخرى. وعلاوة على ذلك، فيمكن أن يقدم تخفيف هائل لحوالى ٥٠% من ضحايا مرض هنتينجتون المحتملين، الذين يبدو أنهم لم يرثوا الجين.

اتجاهات مستقبلية لأبحاث الـ د.ن.أ فى الأمراض الوراثية

Future directions of DNA research in genetic diseases

سيمكن استخدام مجسات الـ د.ن.أ فى النهاية الباحثين من تحديد العيوب الجزيئية الدقيقة فى أمراض مثل Duchenne's muscular dystrophy وتليف

البُنكرياس الحوصلى ومرض هنتينجتون. وتمكن طرق "المشى" أو "القفز" على كروموسوم من التحرك بسرعة أكبر نسبيا من موضع لآخر على الكروموسوم، وسوف تتيح لهم فى النهاية التحرك من العلامات التى حددوها لهذه الأمراض الوراثية إلى الجينات المصابة.

وقد يتأثر تطور بعض الأمراض نسبيا ببعض الاستعدادات الوراثية، على الرغم من أن الحالات لا تكون فى الأصل وراثية تماما. ويختص مجال آخر من الأبحاث باستخدام مجسات الـ د.ن.أ فى تحديد الأشخاص المعرضين لهذه الأمراض، التى قد تشمل أمراض القلب وعلى الأقل بعض السرطانات. وهناك بعض الدلائل، على سبيل المثال، أن بعض الـ د.ن.أ المتعددة الأشكال مرتبطة بجين لبروتين حامل للكلوسترول، قد تظهر استعداد للإصابة بالنوبات القلبية. وهناك جهود لا تزال محل البحث لتحديد الأشخاص المعرضين للإصابة بالسرطان.

وربما تكون الآمال الأكثر إثارة التى تقدمها تكنولوجيا الـ د.ن.أ، هى التمكن فى آخر الأمر من علاج الاضطرابات الوراثية، عن طريق إدخال جينات طبيعية مستنسخة فى مجموعة العوامل الوراثية البشرية (أنظر الفصل الخامس عشر). وفى إحدى الاستراتيجيات، تستخدم المتجهات الفيروسية لحمل جين طبيعى، بالرغم من عدم إمكانية التحكم فى نقطة الإدخال فى مجموعة العوامل الوراثية بواسطة هذه المتجهات. وعلى الرغم من ذلك، يتقدم الباحثون نحو محاولة تجريب هذه الطريقة لتصحيح قصور إنزيم يسبب مرض نقص مناعة شديد. وتعتبر أيضا أعراض مرض Lesch-Nyhan ومرض Gaucher من الأمراض المرشحة للعلاج الجينى بهذا الإجراء.

وهناك استراتيجية أخرى لا تزال في مراحل تطورها المبكرة جداً، وتهدف إلى استبدال الجين الشاذ بنسخة مستنسخة طبيعية. وقد تتجح هذه الطريقة تماماً مع مرض أنيميا الخلية المنجلية والثلاسيميا، التي يجب أن يتم فيها ضبط الجينات بدقة أثناء النمو الطبيعي. وتظهر نتائج الخلايا المنزرعة في المزرعة، أن جينا يمكن أن يدخل في موقعه الطبيعي، على الرغم من أن الإدخال يجب أن يتكرر بصورة أكبر كثيراً من التكرار الذي يتم حالياً، قبل أن تصبح هذه الطريقة فعالة. وعلى الرغم من ذلك، فقد كان مستقبل العلاج بالجين منذ سنوات قليلة ماضية مجرد حلم. وبفضل تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم فقد أصبح هذا الحلم حقيقة.

الفصل الخامس عشر

مستقبل العلاج بالجين للأمراض الوراثية البشرية

The prospect of gene therapy for human hereditary diseases

ربما سيحدث الأثر البالغ العمق للقدرة الجديدة على استغلال الـ د.ن.أ في حقل علاج الأمراض الوراثية البشرية التي تسببها جينات معيبة، والعديد من هذه الحالات نادر نسبياً، وعلى سبيل المثال، يصيب مرض تليف البنكرياس الحوصلي، الذي يعتبر من أكثر الأمراض الوراثية انتشاراً بين القوقازيين يصيب حوالي ١ من كل ١٨٠٠ شخص أبيض في الولايات المتحدة، ومرض أنيميا الخلية المنجلية، الذي يصيب السود أساساً، يحدث بنسبة فرد واحد من كل ٥٠٠ مريض أسود يولد في الولايات المتحدة، وقد تصيب بعض الأمراض الوراثية الأخرى عدد قليل من الأفراد، وعلى الرغم من ذلك، فالتأثير الكلى للعيوب الوراثية يعد كبيراً، ووفقاً للتقديرات الحالية فإنه هناك ما لا يقل عن ٣٠٠٠ مرض وراثي. وعلاوة على ذلك، فإن تأثير هذه العيوب في غالب الأحوال يكون تأثيراً قاتلاً، أو على الأقل موهناً، فأى جين شاذ إما أنه لا ينتج بروتينا على الإطلاق، أو يخلق بروتيناً لا يعمل بالصورة الصحيحة، ويمكن علاج القليل من الأمراض الوراثية تماماً بإعطاء المريض البروتين الذي فشل الجين في إنتاجه بصورة طبيعية، ونوع القزامة dwarfism، التي تحدث بسبب إنتاج غير كاف أو عدم إفراز هرمون النمو من الغدة النخامية pituitary gland، هو مثال ينطبق على ذلك، فالحقن بهرمون النمو البشرى، الذي أصبح حالياً

متوفر بواسطة استئساخ الجين الذى يمكنه المحافظة على النمو الطبيعى إذا عولج به المريض فى وقت مبكر.

ومع ذلك ، فلا تخضع معظم الأمراض الوراثية تماماً للعلاج ، وقد يصدق هذا حتى عندما يتم دراسة الجين المعيب دراسة مستفيضة، كما فى حالة أنيميا الخلية المنجلية، ويمكن للرعاية الطبية الجيدة أن تساعد مرضى الخلية المنجلية على أن يعيشوا عشرات السنين، لكنهم سيتعرضون للوهن ولآلام الخلية المنجلية المبرحة، والأشخاص المصابون بتليف البنكرياس الحوصلى، نادراً ما يعيشون بعد سن العشرين أو الثلاثين ، والأمراض الوراثية الأخرى، مثل مرض تاي-ساكس وبعض الأمراض الوراثية الحادة الناجمة عن نقص المناعة، تنفك بالمرضى فى عمر مبكر، بعد سنة أو بضع سنوات قليلة من ولادتهم .

وكان للقدرة على عزل جينات معينة واستئساخها ، أن فتح الطريق أمام مجال مثير جديد لعلاج الأمراض الوراثية، لم يقتصر فقط على تعويض المريض عن البروتين المفقود، ولكن بإعطائه جيناً جديداً سليماً تماماً يحل محل الجين الذى فشل فى أداء وظيفته، ومنذ بداية الثمانينات، خطى الباحثون خطوات كبيرة نحو تطوير طرق لإدخال جينات جديدة فى خلايا الحيوانات، وأثبتت الجينات فاعليتها تماماً، وأنتجت منتجاتها البروتينية النشطة فى الخلايا التى تم استزراعها فى أطباق المعمل، ومع نهاية عام ١٩٨٤، أصبحت التجارب الإكلينيكية بالعلاج بالجين للمرضى البشر وشيكة الحدوث، إلا أنه قد ظهرت عقبة لم تكن متوقعة، عندما اكتشف الباحثون أن الجينات التى أدخلوها فى خلايا الحيوانات الحية، بطرق مشابهة للطرق التى تم استنباطها للعلاج بالجين البشرى، لم تستطع فى غالب الأحوال أن تعطى كميات وفيرة من البروتينات النشطة.

ومحاولة استخدام طرق نقل الجين gene transfer مع المرضى ستكون محاولات عديمة الجدوى، وحتى غير أخلاقية، إن لم يكن هناك توقع معقول لعمل الجين الجديد بصورة جيدة، وعلى الرغم من ذلك، فلم تعط كل تجارب نقل الجين نتائج سيئة، ففي عدد قليل منها، وجد أن الجينات المدخلة حديثاً في حيوانات التجارب جينات نشطة، على الرغم من أن كميات البروتين التي أنتجتها هذه الجينات لم تكن بالقدر الكافي لتصحيح العيب الوراثي، وعلاوة على ذلك، وجد أن الجينات المنقولة تصحح عيباً جينياً في الخلايا البشرية التي تم استزراعها في المزرعة، ومع منتصف عام ١٩٨٦، أصبح الباحثون مستبشرين مرة أخرى بأن يكون في إمكانهم التغلب على مشاكل تعبير الجين، وأن يكون العلاج بالجين البشري في النهاية مجالاً مطروحاً .

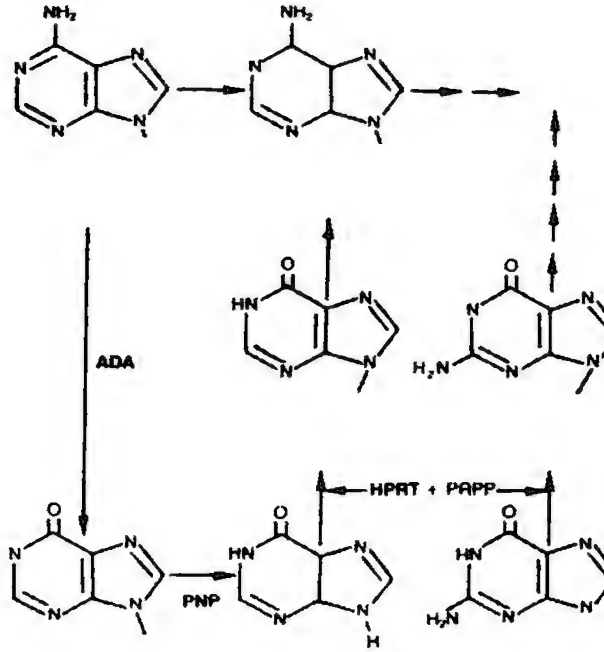
الأمراض المرشحة للعلاج بالجين

Candidates for gene therapy

الأمراض الوراثية التي تعتبر حالياً من أفضل الأمراض المرشحة للعلاج بالجين، هي الأمراض التي يمكن أن يصحح فيها عيب وراثي، عن طريق إدخال جين سليم جديد إلى خلايا نخاع العظم bone marrow cells، ويشكل نخاع العظم الذي يعتبر النسيج الإسفنجي الطرى في تجاويف معظم العظام كلاً من خلايا الدم الحاملة للأكسجين والأنواع العديدة من خلايا الدم البيضاء التي يتطلبها الجسم لزيادة الاستجابات المناعية الفعالة، ويمكن التخلص من خلايا النخاع بسهولة من شخص، بسحبها بواسطة إبرة مجوفة، يتم إدخالها في ظهر عظام الورك. ويمكن الاحتفاظ بهذه الخلايا في أطباق المعمل أثناء إجراء المعالجات

المطلوبة لإدخال جين جديد، وبعد ذلك يتم حقنها بسهولة فى وريد دم المريض، ومنه تعود إلى نخاع العظم نفسه.

ومن بين الحالات التى قد يمكن تصحيحها عن طريق نقل الجين إلى خلايا نخاع العظم نقص فى إنزيمين، يؤدى كل منهما إلى استجابات مناعية منقوصة بشكل حاد، وإلى الوفاة فى مرحلة عمرية مبكرة، والإنزيمان الناقصان هما، أدينوسين ديميناز (ADA) وبورين نكليوسيد فسفوريلاز (PNP)، اللذان يعتبران جزء من المسار الكيميائى الحيوى نفسه لتخليق قواعد البورين، وهما المطلوبان من بين أشياء أخرى كوحدات بنائية للأحماض النووية nucleic acids (شكل ١٥-١). ويؤدى النقص فى أى من هذين الإنزيمين إلى تراكم المركبات، والتى على الرغم من وجودها بتركيزات منخفضة فى الخلية بصورة طبيعية، إلا أنها تصبح سامة عند ازدياد تركيزها.



شكل ١٥ - ١ أبيض البورين، تعتبر إنزيمات أدينوزين ديميناز (ADA) وبورين نكليوسيد فسفوريلاز (PNP) وهيبوكسنتين جواتين فسفوريبوسيل ترانسفيراز (HPRT) جميعاً جزء من مسار أبيض البورين، حيث يحول إنزيم الـ ADA الأدينوزين إلى أيونوزين بإزالة المجموعة الأمينية من قاعدة البورين ويحول الـ PNP الريبوز من أيونوزين، ونتيجة لذلك، ينتج قاعدة هيبوكسنتين خالية من البورين ويحول الـ HPRT ريبوز للفوسفات من فسفوريبوسيل بيروفوسفات (PRPP) إلى هيبوكسنتين وجواتين، وبذلك ينتج أيونوزين مونوفوسفات وجواتوسين مونوفوسفات.

ومن المتوقع أن يجرب العلاج بالجين أولاً مع المرض الناشئ عن نقص أدينوسين ديميناز، الذي يصيب حوالي مائة طفل على مستوى العالم، أما المرض الناشئ عن نقص بورين نكليوسيد فسفوريلاز، فيعتبر من الأمراض النادرة الحدوث جداً - حوالي عشر حالات أو نحو ذلك قد تم التعرف عليهم على مستوى العالم - ولا يلقى اهتماماً كبيراً من أبحاث العلاج بالجين.

وعلى الرغم من أن خلايا جميع الأفراد الذين يعانون من نقص في أدينوسين ديميناز أو بورين نكليوسيد فسفوريلاز تفشل في صنع الإنزيم المطلوب، فالأنواع

الوحيدة التى ظهر أنها تعاني من تأثيرات خطيرة، هى الخلايا اللمفية T و B، وهى الخلايا اللازمة لصنع الاستجابات المناعية الطبيعية، وكنتيجة لذلك، تموت خلايا T و B، ولا يستطيع المرضى مقاومة العدوى، ويموتون بسبب هذا النقص خلال السنوات الأولى القليلة من حياتهم، ولما كانت الخلايا اللمفية T و B من بين الخلايا التى تنشأ فى نخاع العظم، فمن المحتمل علاج العجز الناشئ عن نقص إنزيمات الـ ADA أو الـ PNP، إذا أمكن إدخال نسخة نشطة من الجين المناظر إلى نذيرى ١ الخلايا اللمفية T و B فى نخاع العظم.

ولا يمكن إجراء العلاج بالجين دون وجود الجينات نفسها، وقد توفر هذا الشرط بالنسبة لنقص أنزيمي ADA و PNP، حيث تم استئساخ جينات ADA و PNP البشرية، وهى لذلك متوفرة لإدخالها فى خلايا نخاع العظم، وعلاوة على ذلك، فهناك دلالة على أن هذه الاستراتيجية سيكتب لها النجاح، قد جاءت من النجاح الذى حدث فى استزراع نخاع العظم لعلاج المرضى الذين يعانون من نقص شديد فى المناعة الوراثية، التى تشمل النقص الناشئ عن الـ ADA و PNP، وهذا يوضح أنه من خلال وجود نخاع عظم قادر على صنع خلايا T و B سليمة، فإنه يعتبر كافياً لإبطال الأعراض التى يشكو منها المريض، ولا تحتاج الأنواع الأخرى من خلايا الجسم للعلاج.

وعلى الرغم من أن زرع نخاع العظم يمكن أن يعالج قصور المناعة الوراثي، إلا أنه لا تزال هناك علاجات بديلة مطلوبة، ووفقاً لروبرتسون باركمان Robertson Parkman من مدرسة الطب التابعة جامعة جنوب كاليفورنيا

١ - النذير : هو الشيء الذى يحدث أو يوجد قبل شيء آخر ويؤثر على تطوره. (المترجم)

ومستشفى الأطفال بلوس أنجلوس، الذي صرح بأن استخدام عمليات الزرع سيكون محدوداً بسبب قلة الأشخاص الواهبون لنخاع العظم، حيث يجب أن يتوافق الشخص الواهب لنخاع العظم جينياً مع المريض المتلقي، حتى لا نتعرف الخلايا المناعية الناتجة من نخاع العظم المزروع (المغروس) على أن أنسجة المريض خلايا غريبة وتوجه إليها هجوماً مناعياً. هذا الهجوم الذي يسمى بمرض رفض العائل للطعم "graft-versus-host"، يمكن أن يسبب تلف شديد بالأنسجة ويؤدي إلى وفاة المريض في النهاية .

والموقف المعاكس، ألا وهو رفض الجهاز المناعي للمريض لغرس مخ عظم غريب، لا يعتبر مشكلة كبيرة، فمعظم الأفراد الذين يجرى لهم عمليات زرع لنخاع العظم، يعالجون في البداية بالإشعاع أو العقاقير لتدمير الخلايا المكونة للدم في نخاع عظمهم، ويتم هذا الإجراء أساساً لإفساح المجال للخلايا المنزرعة؛ وإلا فإنها لن تتمكن من ترسيخ نفسها في نخاع العظم، حيث لا يمكنها التغلب على الخلايا الموجودة، في حين يكون للعلاج بالإشعاع أو العقار تأثير أيضاً على كبح الاستجابات المناعية للمريض.

غير أن المرضى الذين يعانون من نقص الـ ADA لا يحتاجون إلى علاج أولى بالإشعاع، فبسبب القصور الحادث في الجهاز المناعي، لا يستطيعون شن هجوم رفضي فعال، وعلاوة على ذلك، فأى خلايا منزرعة ذات جين ADA نشط، يجب أن يكون لها ميزة اختيارية قوية على الخلايا الموجودة المفتقرة للإنزيم، وجميع المرضى الذين يجرى لهم عمليات زرع، يداوون بعقاقير كابحة للمناعة لتقليل احتمال ظهور أمراض رفض العائل للغرس ولرفض الغرس.

ويكون معظم واهبو نخاع العظم من الأشخاص المقربين للمريض، وعادة ما يكون أخ أو أخت، يشابه تماماً تركيبه الوراثي التركيب الوراثي للمريض. وحسب تقدير باركمان Parkman فإن نسبة المرضى الذين قد يستفيدون من عمليات غرس نخاع العظم ويجدون واهبون مناسبون لا تزيد عن ٣٠%، وحتى في حالة وجود توافق بين المريض والواهب، فإن ما بين ١٠ و ٢٠% من المرضى الذين أجريت لهم عمليات غرس نخاع العظم، يموتون بمرض رفض العائل للغرس في غضون سنة من عملية الغرس، ولا يسبب مرض رفض العائل للغرس مشكلة للمرضى، الذين أعيدت لهم خلايا نخاع العظم بعد علاج عيوبها بواسطة نقل الجين.

وهناك حالة ثالثة يتكرر ذكرها بأنها مرشحة أولى محتملة للعلاج بالجين، ألا وهي أعراض ليسك-نيهان Lesch-Nyhan syndrome، التي تنشأ نتيجة نقص إنزيم هيبسوزانثين-جوانين فسفوريبوسيل hypoxanthine-guanine phosphoribosyl (HPRT). وقد تم أيضاً استنساخ جين HPRT البشري، وعلى الرغم من أن هذا الإنزيم يعتبر جزء من المسار التخليقي نفسه مثل الـ ADA و PNP (انظر شكل ١٥-١)، فإن نقص إنزيم HPRT، يسبب سلسلة أكبر من الأعراض عن تلك التي يسببها نقص الإنزيمين الآخرين، ويحدث للمصابين بمرض Lesch-Nyhan syndrome، تركيز عال في دمائهم من حمض البولييك uric acid، الذي ينشأ عن تخليق مفرط من البورينات (أساس مجموعة مركبات حمض البول)، ويسبب النقرس وتلف الكليتين.

ويمكن أن يقلل العلاج التقليدي تركيز حمض البولييك في الدم، ويمنع تلف الكليتين، التي كانت تؤدي إلى وفاة المرضى في مرحلة عمرية مبكرة، وعلى

الرغم من العلاج، يعاني المرضى من مشاكل عصبية خطيرة غير قابلة للعلاج أيضا في الوقت الحالي، وتشمل تدهور القوى العقلية والشلل المخي cerebral palsy وربما الأكثر سوء، نزوعهم إلى جثم أنفسهم، إن لم يكفوا عن ذلك برادع مادي.

والسؤال الذي يبحث عن إجابة، هو هل سيؤدي إدخال نسخة سليمة من جين HPRT في نخاع العظم إلى تخفيف الأعراض العصبية التي تعتبر أعراض مجهولة السبب، فإذا كان نقص الجين يسبب بعض التغيرات الداخلية في التركيب البنوي أو الكيميائي الحيوي لأعصاب المخ، فلا يحتمل أن يكون لإدخال إنزيم HPRT في نخاع العظم فائدة كبيرة، ولكن إذا كانت الأعراض العصبية تنشأ نتيجة لإنتاج مادة كيميائية سامة، فإن إنزيم HPRT فعال حتى ولو لم يكن موجوداً في المخ، فقد يستطيع تخفيض تركيز المادة الكيميائية بدرجة كافية للتخفيف من حدة الاضطرابات العصبية. وهناك نتيجة بحث مشجعة تتعلق بالعلاج بالجين المحتمل لمجموعة أعراض مرض Lesch-Nyhan، هي ملاحظة أن الأفراد الذين لديهم قصور جزئي فقط في HPRT، لديهم تركيز متزايد من حمض البوليك والنقرس، ولا توجد لديهم أعراض عصبية، ونتيجة البحث الأقل تشجيعاً هي التي جاءت في تقرير باركمان وهي أنه لم يحدث تحسناً إكلينيكياً لمرضى Lesch-Nyhan، الذي أجرى له حتى الآن عملية زرع نخاع العظم، بالرغم من أن خلايا الدم البيضاء للمريض أنتجت كميات طبيعية من الـ HPRT بعد عملية الزرع، وربما يكون المريض قد فشل في الاستجابة حيث لم تصل تأثيرات الإنزيم إلى المخ، وهناك احتمال آخر وهو أن عملية الزرع قد تمت في وقت متأخر، بعد أن حدث تلف بالمخ يتعذر علاجه، وبسبب

التشعبات العصبية لمجموعة أعراض مرض الـ Lesch-Nyhan، فربما يكون من الأمراض الأقل قابلية للعلاج بالجين عن علاج نقص الـ ADA أو PNP.

ويبدو من الوهلة الأولى، أن أمراض الأنيميا الوراثية، مثل أنيميا الخلية المنجلية أو الثلاسيميا، هي من أفضل الأمراض المؤهلة لتلقى العلاج بالجين، فالعيوب التي تؤثر على تشفير الجينات لإنتاج بروتينات الهيموجلوبين قد قتلت بحثاً وفهماً، وتم استنساخ الجينات المطلوبة، وتم زرع الخلية التي تعبر فيها هذه الجينات بصورة محددة في نخاع العظم، والمشكلة هي أن تنظيم جينات الجلوبيين تعتبر أكثر تعقيداً من جينات الـ ADA و PNP و HPRT.

تعتبر إنزيمات الـ ADA و PNP و HPRT، الإنزيمات المدبرة لشئون الجسم، والتي تصنع على الدوام في جميع الخلايا، والتي يبدو أنها قادرة على تحمل التغير في المقدار الذي تنتج به، وفي المقابل، لا تنتج بروتينات الجلوبيين إلا في أحد أنواع الخلايا المتخصصة، وهي الخلية التي تنتج خلايا الدم الحمراء، وفي توقيت معين من دورة حياة هذه الخلية، وعلاوة على ذلك، يحتوي جزيء الهيموجلوبين الناضج على بروتينين مختلفين، ويكون تعبير الجينات المناظرة، التي تقع على كروموسومات مختلفة متناسقا بحيث تنتج البروتينات بكميات متساوية تقريباً.

ولم يستطع أحد حتى الآن أن يجري تنظيمًا طبيعيًا لجينات الجلوبيين بصورة كاملة، والتي تم نقلها إلى الخلايا المستزرعة، والجينات المنقولة، على وجه الخصوص، تصنع مقادير صغيرة جداً من المنتج، وسوف يتطلب علاج أمراض الأنيميا إنتاج الهيموجلوبين بكميات شبه طبيعية، وحتى يتم الانتهاء من حل

مشكلة تنظيم جين الجلوبيين، فلن يكون العلاج بالجين لأنيميا الخلية المنجلية وأمراض الأنيميا الوراثية الأخرى علاجاً مجدياً .

ولا تزال هناك أمراض أخرى ذات أصول جينية، غير مؤهلة حالياً للعلاج بالجين، وقد لا يحدث ذلك قبل عدة سنوات ،هذا إن حدث ، وينطبق الحال على أى حالة لم يتم تحديدها واستنساخ جيناتها، وعلى سبيل المثال، تتصف مجموعة أعراض مرض Wiskott-Aldrich، بشذوذ في الخلايا اللمفية ولويحات الدم blood platelets، ويمكن علاجها بعمليات زرع نخاع العظم، والتي يبدو أن العلاج بالجين سينجح معها أيضاً لكن العيب الجيني لم يتم تحديده بعد، ومرض تليف البنكرياس الحوصلي، هو حالة أخرى من حالات الأمراض الوراثية التي لم يصل فيها الباحثون إلى رأى قاطع حتى الآن بالنسبة للجين المصاب، على الرغم من أنهم كادوا يقتربوا من الحل (انظر الفصل الرابع عشر)، وعلى الرغم من ذلك، يتطلب العلاج بالجين كما يخيّل للباحثين الآن أن يكون الحصول على الجين النشط المناسب من الخلايا المشتقة من نخاع العظم كافياً للتخفيف من أعراض المرض، ولن ينجح العلاج مع مرض تليف البنكرياس الحوصلي الذي يصيب العديد من أعضاء الجسم، وعلى وجه الخصوص، الرئتان والكبد والبنكرياس.

طرق نقل الجين

Gene transfer methods

على مدى السنوات العديدة الماضية، طور الباحثون بعض الطرق لإدخال جينات جديدة في الخلايا، وفي واحدة من الطرق المبكرة جداً وربما أكثرها بساطة، تم تحضين خلايا مستزرعة cultured cells مع راسب فوسفات الكالسيوم من دن.أ. ولاحظ فرانك جراهام Frank Graham وأليكس فان دراب Alex van der Eb من جامعة مكماستر في هاميلتون بأنثريو، أن هذه المعالجة للـ دن.أ. تسهل أساساً امتصاص الخلايا للحمض النووي، وأخيراً، قام ميشيل ويجلر Michael Wigler الذي يعمل حالياً في معمل كولد سبرنج هاربر في جزيرة لونج التابعة لنيويورك، وريتشارد أكسل Ritchard Axel وسول سلفرشتين Saul Silverstein من كلية الأطباء والجراحين بجامعة كولومبيا، بتعديل الطريقة كي تستخدم في إدخال جينات مستنسخة فردية في الخلايا، ويمكن أن يندمج الـ دن.أ. الممتص بهذه الطريقة في مجموعة العوامل الوراثية للخلية المستقبلية للراسب، ويمرر من نرية الخلية (أي يمرر إلى الخلايا التي ستتولد من هذه الخلية).

غير أن عدداً قليلاً جداً من الخلايا المحضنة مع رسابة الـ دن.أ. قد امتصت المادة بالفعل. وفي أفضل الأحوال كانت واحدة فقط من كل ١٠٠ إلى ١٠٠٠ خلية هي التي امتصت المادة، وبكفاءة أكثر نموذجية كانت واحدة من كل ١٠٠٠٠ إلى ١٠ مليون خلية (التي امتصت المادة)، وتعني الكفاءة المنخفضة أنه يجب أن تستخدم طريقة اختيار للتعرف على الخلايا النادرة التي تكتسب الـ

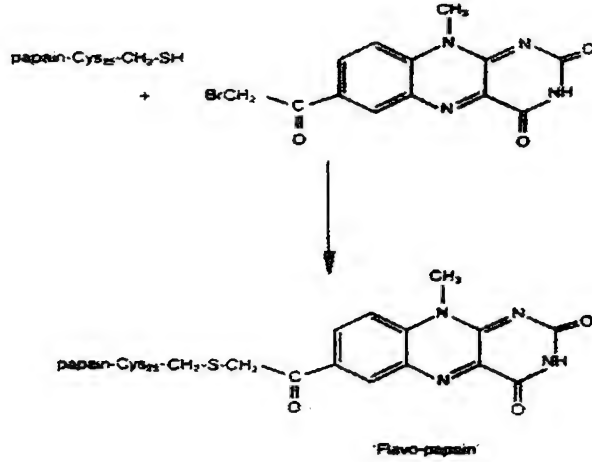
د.ن.أ. الغريب، ويتضمن هذا عادة على نقل جين يضيف نوع من الميزات الممكن تحديدها على الخلية التي تمتص المادة، وجين كهذا قد يشفر عن مقاومة لمضاد حيوى، على سبيل المثال، ولا تنمو الخلايا إلا التي تكتسب الجين فى وجود المضاد الحيوى، بينما ستموت بقية الخلايا الأخرى، وغالباً ما يرغب الباحثون فى نقل جين لا يضيف ميزة اختياريةselectable advantage، ويمكن القيام بهذا ببساطة بنقله مع أحد الجينات التي تضيف الميزة.

وقد أثبتت طريقة فوسفات الكالسيومcalcium phosphate method فائدة كبيرة جداً فى دراسات تحكم تعبير الجينgene expression، حيث ساعدت على سبيل المثال، فى تحديد قطع الـ د.ن.أ. التي تنظم نسخ الجين فى ر.ن.أ. الرسول، ويستطيع الباحثون بمساعدة الـ د.ن.أ. المطعم إلغاء أو تبديل قطع د.ن.أ. معينة داخل وحول جين، ثم يلاحظوا بعد ذلك كيف تؤثر التغييرات على نسخ الجين بعد أن تنتقل التسلسلات المتغيرة(المبدلة) إلى الخلايا المستزرعة بواسطة طريقة فوسفات الكالسيوم.

وعلى الرغم من القيمة الثابتة بالتجربة لتوسط فوسفات الكالسيوم فى نقل الجين فى مجال البيولوجيا الجزيئية الأساسية، إلا أن كفاءتها المنخفضة جعلتها غير مناسبة للاستخدام فى العلاج بالجين، ويتكون نخاع العظم من مجموعة مختلطة من الخلايا فى مراحل نمو مختلفة، ولكي ينجح العلاج بالجين، يجب إدخال الجين الجديد إلى مجموعة فرعية معينة من الخلايا، أى التي من خلية "جذعية" بدائية primitive stem cell، وللخلايا الجذعية القدرة على إنتاج كل نريات الخلايا الرئيسة التي تنشأ فى نخاع العظم(شكل ١٥-٢)، وعندما تنقسم الخلايا الجذعية، فإنها تكون ذرية تتميز على طول مسارات عديدة، وتتطور

بعض الخلايا التي تتحدر منها خلايا الدم الحمراء، بينما يكون البعض الآخر الأنواع العديدة من خلايا الدم البيضاء، ويمكن تشبيه عملية التمايز differentiation بشارع ذي اتجاه واحد؛ فلا تستطيع الخلايا العودة للخلف خلال مسيرتها نحو النضج. وهي تفقد قدرتها أيضاً على الانقسام.

وإذا دخل جين منقول فقط إلى الخلايا الناضجة لسلالة معينة، فسوف يضر طريقه في نهاية الأمر عندما تموت تلك الخلايا الواحدة بعد الأخرى، ومع ذلك، فإذا كان الجين في الخلايا الجذعية، فسوف تستمر في إعادة تزويد نخاع العظم والدم بخلايا تحمل الجين المنقول، والمشكلة هي أن واحدة من كل ١٠٠ إلى ١٠٠٠ فقط من خلايا نخاع العظم، هي خلية جذعية، وقدر وفرنشر أندرسون من معهد القومى للقلب والرئة والدم (NHLBI) فى يتسدا، بولاية مريلاند، أن حوالى من ١٠ إلى ١٠٠ خلية جذعية فقط من عينة نخاع عظم نموذجية سوف تكتسب جيناً بواسطة طريقة فوسفات الكالسيوم، لو كانت كفاءة النقل واحد فى المليون، ويحتوى نخاع العظم الكلى لأى شخص على ما يقرب من ١٠٠ مليون إلى بليون خلية جذعية، وبإعادة إدخال عدد قليل كهذا من الخلايا المتحولة وراثياً، من المحتمل أن يكون له أى تأثير ملحوظ، إلا إذا كانت لها ميزة انتقائية selective advantage هائلة تفوق على مجموعة الخلايا غير المتحولة.



شكل ١٥ - ٢ تمايز الخلايا الجذعية لنخاع العظم، لأية خلية جذعية غير متميزة القدرة على إنتاج جميع أنواع خلايا الدم الرئيسية، التي تشمل: خلايا الدم الحمراء (erythrocytes) والخلايا الضخمة (megakaryocytes) التي تنتج اللويحات اللازمة لتجلط الدم، وأليفات الإيوسين (eosinophiles) وهي خلايا الدم البيضاء التي تحتوي على حبيبات التي تصبغ بصبغ أيوسين أحمر، والكريات المحببة (granulocytes) وهي نوع آخر من خلايا الدم البيضاء المحتوية على الحبيبة، والملتقمت الكبرى (macrophages) والتي سميت بذلك، لأنها الكاسحات التي تبتلع وتكُل مولدات المضاد الغريبة والخلايا التالفة أو الشاذة، أو الخلايا اللمفية B و T. ويدل الرمز CFU-S على وحدة تشكيل مستعمرة طحال ويدل على نوع غير ناضج من الخلايا التي تكون مستعمرات في الطحال، ويكون سبب في سلاسل الخلايا الطويلة الموضحة، وترمز للـ BFU-E إلى وحدات ضاربة للحمرة متكونة بشكل متفرج وهي خلايا أكثر تمايزاً إلى حد ما والتي لا تحدث إلا خلايا الدم الحمراء. وتدل الرموز CFU-E، Meg-Eo على أنواع من الخلايا التي لا تزال أكثر تمايزاً، و تنتج على التوالي خلايا الدم الحمراء، واللويحات وأليفات الإيوسين والكريات المحببة والملتقمت الكبرى.

ولهذا السبب ركز الباحثون المهتمون بتطوير العلاج بالجين جهودهم على استنباط وسائل أكثر فاعلية لنقل الجينات إلى الخلايا بطريقة فوسفات الكالسيوم، فقد تحولوا إلى الفيروسات، التي لها على الأقل من الناحية النظرية القدرة على إصابة كل الخلايا الموجودة في عينة ما، وقد استخدموا الفيروسات الارتجاعية^٢ retroviruses، على وجه الخصوص التي تستخدم الـ ر.ن.أ كمادة وراثية لها.

٢ - الفيروسات الارتجاعية: هي أي مجموعة من الفيروسات التي تحتوي على جديلة واحدة من ر.ن.أ من عائلة Retroviridae والتي لها غلاف حلزوني، وتحتوي على إنزيم reverse transcriptase، الذي يمكن المعلومات الوراثية من ر.ن.أ الفيروسي لأن تصبح جزء من د.ن.أ المائل. (المترجم)

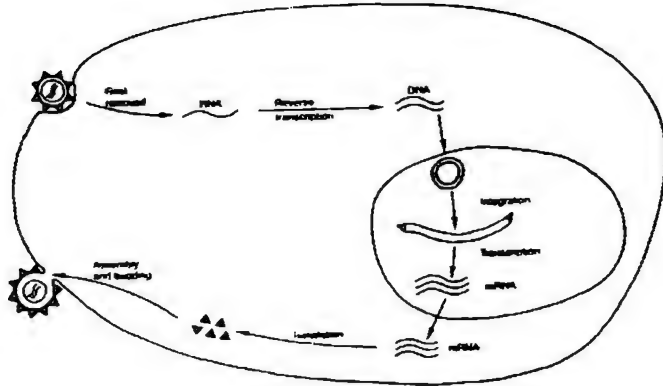
ودورة حياة الفيروسات الارتجاعية تجعل منها أكثر ملاءمة لاستخدامها كحاملات vehicles لنقل الجين (شكل ١٥-٣)، وعندما يصيب أحدها خلية، فإن الإنزيم الفيروسي ريفرس ترانسكربتاز reverse transcriptase يصنع نسخة د.ن.أ من مجموعة العوامل الوراثية ر.ن.أ للفيروس، ويمكن أن يدخل الـ د.ن.أ نفسه في مجموعة العوامل الوراثية لخلية العائل، ويظل هناك بصفة مستديمة، وينتقل إلى الذرية إذا ما انقسمت الخلية، ويكون الـ د.ن.أ المتكامل محاطاً عند كل طرف بواسطة تسلسلات متطابقة تسمى بالتكرارات الطرفية الطويلة long terminal repeats (LTRs)، التي تحتوى على الإشارات المطلوبة لنسخ الجينات الفيروسية في الـ ر.ن.أ (شكل ١٥-٤)، وتعمل جزيئات الـ ر.ن.أ الناتجة بهذه الطريقة، كرسول ر.ن.أ لصنع البروتينات الفيروسية، وتعمل أيضاً كمجموعة عوامل وراثية للجزيئات الفيروسية المتكونة حديثاً.

وسوف ينسخ الجين الغريب أيضاً الذى تم إدخاله فى مجموعة العوامل الوراثية الفيروسية فى ر.ن.أ الرسول فى الخلايا المصابة تحت تأثير الـ LTRs، ووطورت مجموعات عديدة من الباحثين متجهات فيروسية ارتجاعية لنقل الجين، والفيروس الأكثر استخداماً لهذا الغرض هو فيروس مولونى سرطان الدم الفأرى (MMLV) Moloney murine leukaemia virus، والذى كما يدل عليه اسمه يسبب سرطان الدم فى الفئران، إلا أن هذا الفيروس لا يسبب سرطان للدم إلا فى ظل حالات خاصة جداً، عندما تحقن الحيوانات الوليدة بكميات كبيرة من هذا المعامل، ولا ينمو السرطان فى الحيوانات إذا حقن

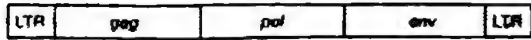
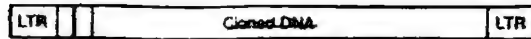
تفـيروس فى فترة متأخرة من عمر الحيوان،على الرغم من أنها تصبح حاملة للفـيروس.

والسبب الذى يجعل فيروس مولونى سرطان دم الفأر يسبب سرطان الدم لا يزال غير واضح، فهو لا يحتوى على أى من جينات مسببة للسرطان تعرف بأنها مسرطنات oncogenes ، وهذه الجينات من مصدر خلوى ويساعد شكلها الطبيعى على التحكم فى نمو الخلية وتطورها، ومع ذلك، يمكنها أن تأخذ صوراً ملتوية، ويحتمل أن يكون السبب فى ذلك نتيجة للتغيرات التركيبية التى تجعلها تصنع منتجات شاذة أو تصنع منتجاتها فى الوقت غير المناسب من دورة حياة الخلية، ويمكنها حينئذ أن تحدث نمواً غير محكم والصفات الأخرى للخلايا الخبيثة، واكتشفت المسرطنات لأول مرة فى فيروسات معينة تسبب السرطان فى الحيوان،والتي يبدو أنها تتعرف عليها فى الخلايا المصابة.

ولا يفضل الأطباء الممارسون إعطاء المرضى فيروساً ارتجاعياً،يكون قادراً على تكرار نفسه والانتشار إلى خلايا أخرى،وخصوصاً حتى لو كانت لهذا الفيروس إمكانية محدودة لإحداث السرطان. ونتيجة لذلك،فإن مجموعة العوامل الوراثية لفيروس MMLV التى استخدمت كمتجهات لنقل الجين،قد تم تعديلها،بحيث لم يصبح الفيروس قادراً على أن يتناسل لكى يصنع الجزيئات المعدية،لكنه يحتفظ بقدرته على الدخول إلى الخلايا المستهدفة،وإيلاج معلوماته الوراثية فى داخل مجموعة العوامل الوراثية الخلوية.



شكل ١٥ - ٣ دورة حياة فيروس فرتجاعي، يدخل الفيروس المعدي الخلية المستهدفة بحيث يزال الغلاف الفيروسي، ويُنسخ بحذر مجموعة العوامل الوراثية رن.أ. وهذه المجموعة تستنسخ أولاً إلى نسخة دن.أ، والتي تستنسخ نفسها إلى شكل من دن.نو جديدة مزدوجة. وبعد أن يكون هذا الجزيء حلقة طاقية يصبح مجموعة عوامل وراثية خلوية، حيث يستنسخ إلى جزيئات رن.رسول مع الجينات الأخرى للخلية، وتتحول جزيئات رن.أ الرسول الفيروسي لتنتج البروتينات العديدة المطلوبة لصنع جزيء فيروس معدي بعد ذلك. يتجمع الـ رن.أ الفيروسي مع البروتينات في صورة فيروس كامل، الذي يتبرعم من الخلية لإقترز فيروس معدي طليق.



شكل ١٥ - ٤ فيروس سرطان دم فاري مولوني ومتجه، يمثل القضيبي العلوي تمثيلاً تخطيطياً لمجموعة العوامل الوراثية للفيروس سرطان الدم الفاري مولوني، وعلى الأطراف توجد التكرارات الطرفية الطويلة (LTRs)، التي تحتوي على التسلسلات المطلوبة لتحويل نسخة الـ دن.أ للـ رن.أ الفيروسي إلى مجموعة عوامل وراثية للخلية العاقلة، وأيضاً للتحكم في نسخ الجينات الفيروسيّة، ويمثل القضيبي الأسود التسلسل المطلوب لتجميع مجموعة العوامل الوراثية الفيروسيّة في صورة جزيئات فيروسيّة معدية كاملة، وترمز مناطق الـ gag و pol و env على التوالي إلى الجينات المشفرة عن البروتينات الفيروسيّة الأساسية، ويرفس ترانسكربتات البروتينات الغلافية، ولصّل متجهات لنقل الجين، فإن معظم التسلسلات الفيروسيّة باستثناء الـ LTRs وتسلسل التجميع (التحزيم) يستبدل بالجين أو الجينات المستنسخة التي مستقل، والفيروس المساعد (helper)، الذي يصنع البروتينات المطلوبة لتجميع المنتج في صورة جزيئات معدية يحتفظ بجينات gag و pol و env ومع ذلك بحذف تسلسل التجميع بحيث لا يمكن تحدد مجموعة العوامل الوراثية المساعدة في صورة جزيئات معدية.

وتحمل مجموعة العوامل الوراثية لفيروس MMLV مثل معظم الفيروسات الارتجاعية الأخرى ثلاث جينات رئيسة هي: جين pol، الذى يشفر عن ريفرس ترنسكبتاز، وجين env، الذى يشفر عن بروتينات الغلاف الفيروسي الخارجى، وجين gag، الذى يشفر عن البروتينات الداخلية للمادة الفيروسية (شكل ١٥-٤). ولعمل المتجهات، اعتادت تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم على تشكيل هذه الجينات الثلاثة وإحلالها محل أى جين يرغب الباحث فى نقله-جين ADA أو جين HPRT على سبيل المثال، وقد يمكن أيضاً دمج جين يشفر عن المقاومة لمضاد حيوى أو عن خاصية اختيارية أخرى فى مجموعة العوامل الوراثية للمتجه لإضافة ميزة اختيارية للخلايا التى تحتوى عليه.

ولا تعتبر المقادير الفيروسية الضئيلة جداً من جزيئات الـ د.ن.أ. أو الـ ر.ن.أ. معدية، حيث يجب أن تتجمع فى صورة جزيئات فيروسية كاملة لكى تدخل الخلايا بصورة فعالة، ولا يستطيع متجه د.ن.أ. الفيروسي الارتجاعى أن يجمع نفسه، لأنه لم يعد يحتوى على الجينات التى تصنع البروتينات الفيروسية الأساسية، ولكى ينتج المتجه المعدى، فإنه يجرى إدخال الـ د.ن.أ. الفيروسي المطعم بطريقة فوسفات الكالسيوم إلى سلالة من الخلايا تحمل فيروس "المساعد"، الذى يشفر عن البروتينات gag و pol و env، وعادة ما يتم تجميع كلاً من الفيروس المساعد والفيروس المتجه فى الجزيئات المعدية فى ظل هذه الظروف، ولا يعتبر هذا مرغوباً لأنه لا توجد وسيلة لفصل الفيروسين عن بعضهما، ولو أدخل كلا الفيروسين إلى خلايا نخاع العظم، فإنها تتكاثر هناك وتتشر.

إلا أنه يمكن منع تكوين الفيروس المساعد، حيث جاء التطور الرئيس فى عام

١٩٨٣، عندما أقر دافيد مان David Mann وريتشارد ملجيان Ritchard Mulligan

ودافيد بالتيمور David Baltimore من معهد ماسوشيوستس للتكنولوجيا فى كمبردج بولاية ماساشوسستس، بأن مجموعات العوامل الوراثية للفيروسات الارتجاعية تحمل تسلسلا الذى يقع بالقرب من التكرار الطرفى الطويل الأيسر وجين gag، و يكون ضرورياً من أجل تجميع الـ ر.ن.أ الفيروسى فى صورة جزيئات كاملة ، فإذا ازيل التسلسل التجميعى من ر.ن.أ الفيروس المساعد فلا يمكنه أن يصنع جزيئات فيروسية سليمة، ونتيجة لذلك، فإن المادة المعدية الوحيدة التى تخرج من الخلايا، هى متجه فيروس التضاعف المعيب.

وقد طور باحثون من معامل عديدة هذه المتجهات واستخدموها فى إدخال عدة أنواع من الجينات الغريبة داخل الخلايا المستزرعة، بما فيها خلايا نخاع العظم، وعلى سبيل المثال، فقد أدخل مليجان Mulligan وزملاؤه جيناً يشفر عن المقاومة لمضاد الحيوى النيوميسين neomycin فى داخل خلايا مخ عظم الفأر، وعمل تيودور فريدمان Theodore Friedman وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيا فى سان دييجو مع Inder Verma و A. Dusty Miller من معهد سالك فى لا جولا بكاليفورنيا، فى إدخال جين HPRT فى خلايا مخ عظم الفأر، واستطاع الجين المنقول أن يعبر، على الرغم من أنه فى ذلك الوقت، لم يكن من المستطاع تحديد ما إذا كان نشطا فى الخلايا الجذعية.

وعلى الرغم من النجاحات التى حدثت مع الخلايا المستزرعة، فقد كانت النتائج فى أغلب المرات مثيرة للإحباط، عندما أخذ الباحثون يحاولون إدخال جينات فى مخ عظم الحيوانات الحية، ففى هذه التجارب، كانت تزال خلايا نخاع العظم من الحيوانات، وعادة ما كانت فئران، وتحضن مع متجه فيروسى يحمل الجين المرغوب نقله (شكل ١٥-٥)، ثم يعاد حقن الخلايا فى الفئران، التى

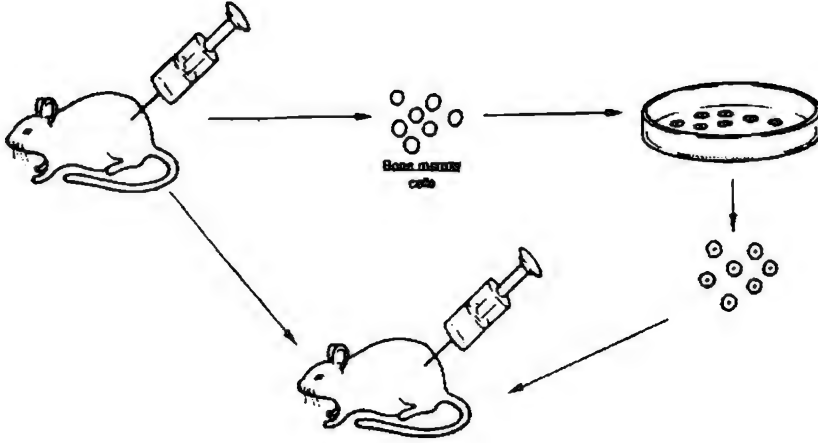
تعرضت لجرعة كافية من الأشعة السينية لتدمير نخاع عظامها، وتعتبر هذه الطريقة من طرق المعالجة القاتلة، غير أن خلايا نخاع العظم المعاد حقنها جددت نخاع الحيوانات مرة أخرى وجعلتها تعيش، ويشبه بروتوكول هذه التجارب، البروتوكول المخطط لمحاولات العلاج بالجين البشري، بالرغم من أن الأطباء المجربين يأملون في أن يكون في مقدورهم تجنب المرحلة التي يدمر فيها نخاع عظم المريض، وبالرغم من ذلك، فقد تكون هذه المرحلة ضرورية، إذا لم نستطع الخلايا المبدلة وراثياً التغلب على مجموعة الخلايا الموجودة في نخاع العظم.

وعلى أية حال، يستطيع الباحثون الكشف عن الـ د.ن.أ الفيروسي، على الأقل في بعض الخلايا الناتجة من نخاع العظم المعاد تشكيله في الفئران، ولكنهم عندما بحثوا عن الإنتاج الفعلي للإنزيمات التي حددتها الجينات المنقولة، فلم يكونوا يجدوها عادة، بيد أنه كانت هناك بعض الاستثناءات، فقد أدخلت ثلاث مجموعات مستقلة، جين مقاومة النيوميسين في نخاع عظم الفئران، ووجدت أن المنتج الجيني قد صنع بتركيزات قليلة نسبياً في أنواع الخلايا العديدة المنتجة من نخاع العظم، وأظهر إنتاج الإنزيم بواسطة أنواع مختلفة من الخلايا المشتقة من نخاع العظم، أن جين المقاومة للنيوميسين قد دخل الخلايا الجذعية وظل نشطاً . والمجموعات الثلاث التي قامت بنقل الجين هي مجموعة ألان برنشتين Alan Bernstein من مركز أبحاث مستشفى جبل سيناء في ترنتو بكندا، الذين تعاونوا مع روبرت فيليبس Robert Phillips من مستشفى تلك المدينة للأطفال المرضى، وجوردون كيللر Gordon Keller من معهد بازل للمناعة بسويسرا وأيروين وانجر Erwin Wagner من معمل البيولوجيا الجزيئية الأوروبية في هيدلبرج

بجمهورية ألمانيا الاتحادية، و أندرسون Anderson وزملاؤه. وفى الآونة الأخيرة ، استطاع أندرسون Anderson وأرثر نينهيسوس Arthur Nienhius من معهد القومى للقلب والرئة والدم NHLBI وريتشارد أوريللي Richard O'Reilly من معهد سرطان سلوان-كترنج التذكارى فى مدينة نيويورك، أن يحرزوا نجاحاً أيضاً عندما قاموا بإدخال الجين البشرى ADA فى نخاع عظم قروود حية. وأنتجت الخلايا المأخوذة من نخاع العظم من خمس من القروود السبعة المستخدمة الإنزيم البشرى، وعلى الرغم من أن مستويات التعبير، كانت حوالى ١٠% فقط من تلك التى اعتقد أنها ضرورية للتغلب على التأثيرات الناجمة عن نقص الـ ADA، فقد كانت النتائج على الرغم من ذلك مشجعة من وجهة نظر استخدام الطرق فى النهاية للعلاج بالجين البشرى، فعندما حاول مليجان مع دافيد ويليامز David William وستيورات أوركين Sturat Orkin من المدرسة الطبية بهارفارد القيام بنقل مماثل لجين الـ ADA البشرى إلى الفئران، فلم يتمكنوا من الحصول على تعبير الجين فى معظم الحيوانات، على الرغم من أنه كان موجود فى خلايا الحيوانات بصورة سليمة وغير معاد ترتيبه.

وعلى الرغم من ذلك، فقد وجدت كلا المجموعتين أن الخلايا اللمفية التى تد الحصول عليها من المرضى المصابون بنقص الـ ADA، وتم زراعتها فى مزرعة، يمكن أن "تعالج" عن طريق إدخال نسخة سليمة من جين الـ ADA، ويحمى الإنزيم المنتج بطريقة الجين المنقول الخلايا اللمفية من تأثيرات المادة الكيميائية السامة التى يمكنها لولا ذلك أن تقتل الخلايا، وتدل النتائج على أنه إذا أمكن إدخال جين ADA نشط إلى الخلايا الجذعية بنخاع العظم، فسوف يكون لها

التأثير المطلوب فى حماية الخلايا اللمفية من التأثيرات القاتلة الناجمة عن نقص إنزيم الوراثة.



شكل ١٥ - أسلوب العلاج بالجين، تسحب خلايا نخاع العظم من الحيوان الذى سيتلقى العلاج بالجين بواسطة حقنة، بعد ذلك تستزرع الخلايا مع الخلايا التى تنتج المتجه الفيروسي، الذى سيستخدم فى إدخال الجين الجديد إلى الحيوان، ويتعرض الفئر إلى جرعة من الأشعة السينية التى تقوم بتدمير نخاع عظمه ثم بعد حفر خلايا نخاع العظم التى اكتسبت الجين الجديد، ويستخدم أسلوباً مشابهاً لعلاج الأمراض الوراثية البشرية، على الرغم من أن الأطباء المحيرين يفضلون تجنب خطوة إعطاء جرعة الأشعة السينية .

والسبب فى توصل بعض الباحثين إلى نتائج أفضل من النتائج التى حصل عليها باحثين آخرين لا يزال غير واضحاً، على الرغم من وجود دلائل بأن الإجابة قد تكمن فى المتجهات، فقد كانت كل من مجموعة أندرسون ومجموعة كيللر ووجنر تستخدم متجهاً قام باستنباذه أيلى جيلبوا وزملاؤه فى جامعة برنكتون، واستخدم برنشتين وفيليبس متجهاً أنشأه بأنفسهما، فى حين كان تصميمه يشبه تصميم متجه مجموعة جيلبوا.

وميللر Miller، الذى يعمل حالياً فى مركز أبحاث سرطان فريد هتشسون فى سينل، و راندى هوك Randy Hock الذى يعمل بنفس المعهد، ذكرا فى تقريرهما مؤخراً نتيجة مشجعة أخرى مع متجه جيلبوا، الذى قد يقرب العلاج بالجين

البشرى للأمراض الوراثية خطوة للأمام، وقد واجه الباحثون مشاكل فى الحصول على تعبير الجينات المنقولة إلى خلايا نخاع العظم البشرى فى المزرعة، ولكن عندما استخدم ميللر وهوك متجه جيلبوا لنقل أحد جينى المقاومة للمضاد الحيوى داخل الخلايا البشرية، فقد أصيب ما بين ٥% إلى ٢٠%، وأصبحت مقاومة للمضاد الحيوى المناسب ، ولم تستطع مجموعة باحثو سينل أن يحددوا فى هذه التجارب ما إذا كانت الجينات قد دخلت الخلايا الجذعية، فى حين أن تعبيرها يمكن الكشف عنه فى خلايا نخاع العظم "السلف"،والتي على الرغم من أنها أكثر تطوراً عن الخلايا الجذعية الحقيقية فلا تزال غير ناضجة، وقد استطاع أيضاً برنشتين وفيليبس وزملاؤهما أن يدخلوا جين نشط مقاوم للمضاد الحيوى إلى الخلايا السلفية progenitor cells من نخاع العظم البشرى.

ويهتم الباحثون بمعرفة لماذا كانت تعمل الجينات المنقولة بصورة أفضل على نحو متكرر فى الخلايا النامية فى المزرعة عن تلك الجينات المنقولة إلى الحيوانات الحية، وربما تنحصر المشكلة فى وجود اختلاف بيولوجى بين الخلايا الجذعية البدائية والخلايا المستزرعة العادية، وكما ذكر من قبل، فللحصول على تعبير مستديم من جين منقول فى الحيوانات الحية، يجب أن يدخل الجين إلى الخلايا الجذعية بنخاع العظم ويستعيد نشاطه هناك، وقد اكتشف برنشتين وفيليبس وزملاؤهما أن الجينات المنقولة تصبح نشطة عندما تدخل أولاً إلى الخلايا الجذعية، لكنها تتوقف عن نشاطها بعد ذلك، ويقترح البحث الذى قدم من معمل بيتر رجبى فى الكلية الامبريالية للعلوم والتكنولوجيا فى لندن، أن التكرارات الطرفية الطويلة وفيروس مولونى سرطان الدم الفأرى يخمد نشاطها

فى الخلايا الجذعية، وقد يكون ذلك بسبب التعبير الضعيف هناك للجينات المنقولة بواسطة المتجهات المأخوذة من هذا الفيروس، ويتوافق ضعف النشاط هذا مع نتيجة بحث لمجموعة مليجان، فى أن جين الـ ADA موجود بصورة سليمة فى خلايا مخ عظم الفأر، لكنه برغم ذلك غير نشط.

ومن الواضح أن المتجهات الفيروسية تحتاج إلى التعامل معها بطريقة بارعة قبل استخدامها فى تجارب العلاج بالجين البشرى، فلا يستهدف البحث الجديد تحسين تعبير الجينات المنقولة بواسطة المتجهات، ولكنه يستهدف تجاهل مشكلة أمان محتملة، وتسبب بعض الفيروسات الارتجاعية سرطان فى الحيوانات بدخولها فى مجموعة العوامل الوراثية الخلوية بالقرب من أحد الجينات التى لها إمكانية تسرطن، ويصبح السرطن المحتمل بعد ذلك منشطاً من خلال وجوده تحت سيطرة التكرار الطرفى الطويل الفيروسى، الذى يعتبر محرضاً قوياً على تعبير الجين، ولا أحد يعرف ما إذا كانت المتجهات الفيروسية التى يجرى الاهتمام بها لكى تستخدم فى العلاج بالجين، أنها قد تنشط مسرطناً بطريقة غير مقصودة، عندما تدخل بالقرب منه فى مجموعة العوامل الوراثية، فى حين يصمم الباحثون بما فيهم برنشتين وجيلبوا ومليجان متجهاتهم الجديدة بطريقة ما بحيث تختفى التكرارات الطرفية الطويلة عندما تتكامل جزيئات الـ د.ن.أ الفيروسية، التى يجب أن تقلل احتمالية تنشيط مسرطن.

وبدون التكرارات الطرفية الطويلة الفيروسية، فلن تعبر الجينات المنقولة إلا إذا ارتبطت بتسلسلات منظمة أخرى تعمل على تنشيط نسخ الجين، ويمكن إما أن يترك الجين مرتبطاً بتسلسلاته المنظمة، أو يمكن وصله بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم بتسلسلات أخرى محرصة ومحفزة.

وتتدمج الجينات المنقولة بالطرق الحالية بطريقة عشوائية داخل مجموعة العوامل الوراثية الخلوية، ولا يستطيع الباحث توجيهها إلى أى موقع معين، والفرص التى يدخل فيها الجين إلى موقعه الكروموسومى الطبيعى، تعد فرصاً ضئيلة، ولا تزال تأثيرات البيئة الكروموسومية على تنظيم الجين مفتقرة إلى الفهم، لكنه من المتصور أن يكون جين منقول منظماً بصورة أفضل إذا أمكن توجيهه لكى يدخل فى الموقع الصحيح. مثل هذا التطور قد يحسن مستقبل العلاج بالجين لأمراض الأنيميا الوراثية، على سبيل المثال، أو أى حالة أخرى يكون التحكم الدقيق فى نقل الجين مسألة حيوية، وربما تكون أفضل هؤلاء جميعاً من وجهة نظر العلاج بالجين، القدرة على إحلال تسلسل جين معيب بدقة بتسلسل سليم مناظر له، وهناك حالة مماثلة تطبق مع الخميرة، لكنها غير قابلة للتطبيق مع الخلايا الثديية.

وقد أوضح مؤخراً أوليفر سميث Oliver Smithies من جامعة ويسكنسين فى ماديسون وراجو كشر لاباتى من جامعة شيكاغو وزملاؤهما، أنه من الممكن توجيه جين جلوبين بيتا البشرى، بحيث يدخل فى موقعه الكروموسومى الطبيعى، بالرغم من عدم توصلهم إلى إحلال دقيق لجين جلوبين بيتا الباطنى النمو بجين جديد، وكان الجين محاطاً من جانبيه بكل من متجه الـ د.ن.أ. وبقطع من جين جلوبين بيتا الباطنى النمو. وعلاوة على ذلك، يعتبر حدوث الإدخال الموجه قليل جداً، فحوالى خلية واحدة فقط من بين ١٠٠٠ خلية من التى شغلت الـ د.ن.أ. اندمجت مع جين جلوبين بيتا فى الموقع الكروموسومى الصحيح، وهذا يعنى أن الطريقة ليست فعالة بدرجة كافية لأن تستخدم فى إدخال الجينات إلى الخلايا الجذعية بنخاع العظم للعلاج بالجين، وبرغم ذلك، فقد أوضح

على الأقل سميثيز وكشر لاباى وزملاؤهما جدوى إدخال الجين، وفتحوا الطريق لتطوير طرق أكثر فاعلية يمكن استخدامها للعلاج بالجين.

نقل الجين إلى سلسلة جرثومية

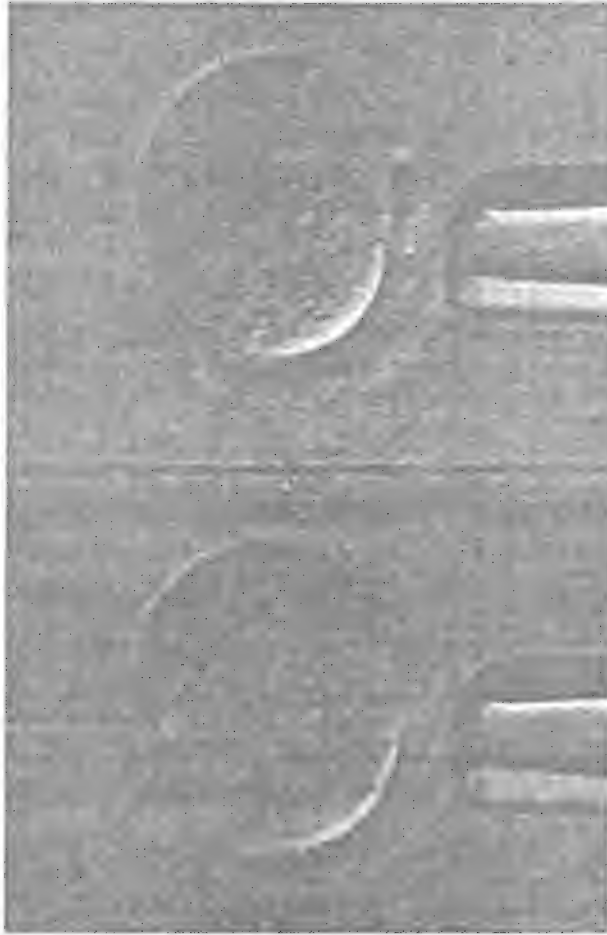
Gene transfer into germ line

طرق نقل الجين التى يجرى تطويرها حالياً لتستخدم فى علاج الأمراض الوراثية البشرية، لا تدخل جينات جديدة إلا فى خلايا جسمية somatic cells، مثل خلايا نخاع العظم، ولن تنتقل هذه الجينات إلى الأجيال القادمة (أى أنها لن تورث إلى الأبناء)، فلا يمكن أن ينتقل جين إلى ذرية شخص إلا إذا كان موجوداً فى الخلايا الجرثومية germ cells، التى تنتج البويضة والحيوان المنوى.

وعلى مدى السنوات العديدة الماضية، وجد الباحثون أن بإمكانهم إدخال جينات جديدة إلى الخلايا الجرثومية لحيوانات التجارب، التى تشمل الفئران وذباب الفاكهة، وقد يتم نقل الجينات إلى الفئران عن طريق حقن جين مستنسخ cloned gene بواسطة إبرة رفيعة جداً إلى نوى بويضات مخصبة حديثاً، بينما لا تزال فى مرحلة الخلية الواحدة (شكل ١٥-٦)، ويتم الحصول على البويضات بعد إسقاطها من رحم إناث تزاوجت مؤخراً، وتلك البويضات التى تتحمل إجراء الحقن الدقيق نوعاً ما، يتم زرعها فى أرحام أمهات بالرضاعة foster mothers، حيث يمكنها أن تنمو بصورة طبيعية حتى موعد الولادة.

وإذا اندمج الجين المحقون فى مجموعة العوامل الوراثية للبويضة المخصبة قبل انقسامها فسوف تحتوى كل خلايا الحيوان الناتج (الوليد) على الجين المنقول، بما فيها الخلايا الجرثومية، إلا أنه أحياناً، لا يحدث الاندماج قبل انقسام

الخلية الأولى للمضغة (قبل أن يصبح جنيناً)، وفي هذه الحالة، فلا يورث الجين لكل خلايا الجسم، وفي جميع الحالات يندمج الجين المنقول بصورة عشوائية في مجموعة العوامل الوراثية للفأر.

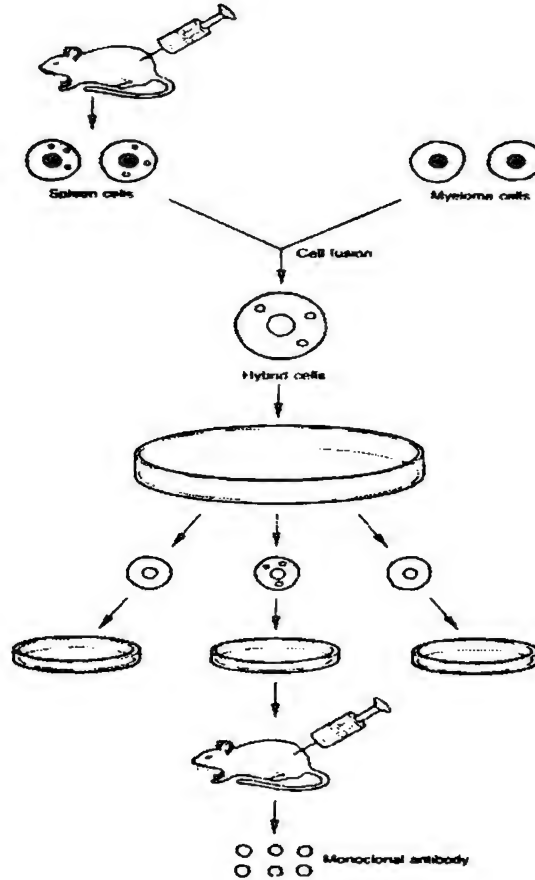


شكل ١٥ - ٦ حقن بويضة فأر، توضح الصورة الطوية بويضة فأر مخصبة حديثاً، والتي توضع فوق ماصة كهبردة (قنبوب) تحول مدرج لقياس الموائل ونقلها من وعاء آخر بواسطة المص)، والفؤاة الأولية الذكرية (وهي نواة الحيوان المنوى قبل التماثلها مع نواة البويضة) يجري حقنها مع د.ن. ١ غريب بواسطة ماصة صغيرة يبلغ قطرها حوالي ١.٥ ميكرومتر. وتوضح الصورة السفلى تزويد نواة الحيوان المنوى الأولية بسبب الحقن، ويرى أيضاً تحت الخطأ الخرجى الصلى تسلل للبويضة بالقرب من الماصة الحاملة بقبسة من الحيوان المنوى المخصب.

وبواسطة أيادى أكثر مهارة ،فإن حوالى من ٥ إلى ١٠% من بويضات الفأر المحقونة تعيش وتنمو إلى أجلها الطبيعى،فحوالى ٣٠% من الحيوانات التى تولد تحمل الجين الغريب،ويمكنها أن تنقله إلى ذريتها، ومن الباحثين الذين كان لهم قصب السبق فى طرق حقن بويضة الفأر، رالف برنستر Ralph Brinster من مدرسة طب البيطرى بجامعة بنسلفانيا وريتشارد بالمتر Richard Palmister من جامعة واشنطن فى سياتل، وفرانك قسطنطيني Frank Costantini من كلية الأطباء والجراحين بجامعة كولومبيا فى مدينة نيويورك وإليزابيث لاسي Elizabeth Lacy من معهد سرطان سلوان-كيترينج التكرارى وأيضاً من مدينة نيويورك، وبيتريس منتز Beatrice Mintz من مركز سرطان فوكس شيز فى فيلاديفيا، وفرانك ردل Frank Ruddle من جامعة يل فى نيوهافن بولاية كونكتيكت.

ولم تأت التجارب الأولى للجينات المنقولة خاصة بأية منتجات فعالة من الفئران التى نقلت إليها الجينات، ويرجع السبب الغالب لهذا الفشل إلى الترتيبات المعادة والتمزق المتلاحق للجينات،فى حين أسهم التحكم الخاطئ أيضاً فى مشاكل التعبير، ففى عام ١٩٨٢، وجد برنستر وبالمتر وزملاؤهما، إن بإمكانهم الحصول على تعبير جيد من الجينات المنقولة، عن طريق ربطها بتسلسل منظم، يعتبر محرضاً قوياً للنسخ. وقاموا بإنشاء جينات مهجنة، تم فيها ربط التسلسلات المشفرة عن تركيب البروتين بمحرض جين الميتالوثيونين metallothionein، ويعتبر ميتالوثيونين بروتين يمكنه الارتباط بمعادن سامة مثل الكاديوم والزنك، و من ثم يزيلها من الدورة الدموية، ويحتفظ محرض الميتالوثيونين عادة بالجين فى حالة نشاط، لكنه يستجيب أيضاً للتركيزات العالية للمعادن من خلال زيادة نسخه.

وأوضحت مجموعة برنستر-بالمتر Brinster-Palmiter فى البداية، أن هناك جين مهجن يحتوى على محرض الميتالوثيونين بالإضافة إلى جين فيروسى لإنزيم ثيميدين كيناز thymidine kinase، يعبر فى الفئران، وكان التعبير جيداً على وجه الخصوص، عندما أعطت الحيوانات جرعات شبه قاتلة من الكادميوم أو الزنك، وهما المعدنان اللذان يزيدان بصورة طبيعية تعبير جين الميتالوثيونين، وفى تجارب لاحقة قاموا بتثبيت محرض الميتالوثيونين بجين إما للفأر أو لهرمون النمو البشرى ، ولم تحمل فقط بعض الفئران التى تطورت من البويضات المحقونة بواسطة الجينات المهجنة الـ د.ن.أ الغريب فى خلاياها، لكنها أيضاً صنعت هرمون النمو المماثل، وكبرت بصورة أسرع من صغار الحيوان littermates، التى لم تكتسب الجين الغريب (شكل ١٥-٧).



شكل ١٥ - ٧ 'الفقر الضخم'، الفئران أخوان من نفس البطن، ويبلغ عمرها ٢٤ أسبوعاً، والحيوان الموجود في يمين الصورة، الذي وزن ضعف أخيه الطبيعي يحتوي على جين جديد مهجن، يتكون من تسلسلات منظمة من جين الميتالوثيونين، التي تم ربطها بالتسلسلات المشفرة عن البروتين في جين هرمون النمو البشري، وقد تم إدخال الجين بواسطة حقن البويضة، ودمج مع د.ن.أ. الفأر الذي نما، وانتقل الجين القريب إلى نرية الحيوان، وتلك الحيوانات التي اكتسبت هذا الجين كبرت أيضاً وأصبحت ضعف وزنها الطبيعي. ويمثل القضيب المنحني تركيب الجين المنقول، ويمثل اللون الأصفر تسلسل الميتالوثيونين، ويمثل اللون الأحمر تسلسل هرمون النمو البشري، والمنطقة المحددة بالعلامة pBR، هي من متجه تستخدم في الأساس لاستمساخ الجين المهجن.

وكانت الجينات المهجنة في الفئران المسيطر عليها أكثر شبهاً بجين الميتالوثيونين عن جين هرمون النمو، وعادة لا يصنع هرمون النمو إلا في الغدة النخامية pituitary gland في قاعدة المخ، لكنه في هذه الحيوانات كان يخلق أساساً

فى الكبد والكلىتين، وهما المركزان اللذان ينتج بهما الميتالوثيونين عادة ، وعلاوة على ذلك، كان يحفز الكادميوم والزنك على تعبير الجينات المهجنة، ومنذ هذه التجارب الأولى، أوضح العديد من الباحثين أن الجينات المدخلة فى الفئران بواسطة حقن البويضة يمكن التحكم فيها بطريقة عادية. وجاء نموذج حديث من هوارد جودمان Howard Goodman وزملائى فى المستشفى العام بماساشوسيتس ومدرسة هارفارد الطبية فى بوسطن، فالأنسولين يجب ألا يخلق إلا فى خلايا بيتا فى البنكرياس، ويجب أن يحفز الإنتاج بواسطة تركيزات متزايدة من سكر جلوكوز الدم، وقد وجدت مجموعة جودمان أن تعبير جين الأنسولين البشرى فى الفئران قد اتبع هذا النمط الطبيعى. ويمكن إدخال الجينات أيضاً فى سلاسل من ذباب الفاكهة بطرق حقن البويضة، والتي قام بتطويرها جيرالد روبين Gerald Rubin والين سبراندلنج Allen Spradling من قسم الأجنة بمؤسسة كارنيجى بواشنطن والتي تقع فى بالتيمور بولاية مرييلاند، واكتشف روبين وسبراندلنج أن "العناصر الانتقالية" Transposable elements، تصنع متجهات مناسبة تماماً لطرق نقل الجين، وقبل ذلك، لم ينجح نقل الجين إلى ذباب الفاكهة.

والعناصر الانتقالية، هى قطع موجودة بصورة طبيعية فى الـ د.ن.أ، يمكنها القفز حول مجموعة العوامل الوراثية لنوع العائل، وتهبط أحياناً فى الجينات، ونتيجة لذلك تسبب الطفرات، ويعتقد بأن هذه العناصر موجودة فى كل الأنواع، لكنه لم تعزل حتى الآن إلا من البكتيريا والخميرة والذرة وذبابة الفاكهة، وفى عام ١٩٨٢، عزل روبرت وسبراندلنج عنصراً انتقالياً من نوع خاص من ذبابة الفاكهة، يسمى بعنصر P. وقد أوضح أن الجينات التى اندمجت مع العنصر P، وحقنت فى أجنة ذبابة فاكهة صغيرة، تنتقل بكفاءة عالية جداً - ٥٠% أو

أكثر - إلى السلاسل الجرثومية للحشرات الناتجة، في حين تهرب هذه الجينات المنقولة من تغيير الأوضاع ، وغالباً ما تشاهد في الجينات التى نقلت إلى الفئران بواسطة حقن البويضة بدون الاستفادة من عنصر P.

وكان لكفاءة الاندماج العالية وقلة تغيير أوضاع الجينات التى يقوم بها عنصر P، أن جعلت العديد من الباحثين يحاولون استخدامه كمتجه لنقل الجين إلى الخلايا الثديية، ولم يكتب لهم النجاح حتى الآن، ومع ذلك، فإن روبين الذى يعمل حالياً بجامعة كاليفورنيا وزميله فى بركلى ،فرانك لاسكى ودونالد ريو،ربما يكونوا قد اكتشفوا السبب فى عدم فعالية العنصر P، لاستخدامه كمتجه فى الخلايا الثديية. وتتطلب حركة العنصر فى مجموعة العوامل الوراثية نشاط إنزيم يسمى ترانسبوساز، الذى يشفر عنه العنصر P نفسه وفى ذبابة الفاكهة، لا ينشط الترنبوساز إلا فى الخلايا الجرثومية، وقد كشف البحث الذى قام به حالياً باحثو باركللى السبب فى خمود الإنزيم فى الخلايا الجسدية، حيث تفتقر الخلايا إلى القدرة على إزالة واحد من التسلسلات الثلاثة المعترضة التى تقسم جين ترانسبوساز إلى أربع قطع، وكنتيجة لذلك، لا تستطيع الخلايا الجسدية أن تصنع ر.ن.أ رسول نشط للإنزيم. ومضى روبين وزملاؤه يوضحون أنه إذا أزالوا التسلسل المعترض من جين ترانسبوساز، فإن العنصر P سيعمل فى الخلايا الجسدية لذبابة الفاكهة بالإضافة إلى الخلايا الجرثومية، ومن الممكن استخدام نفس الاستراتيجية فى استخدام العنصر P كمتجه للخلايا انديية.

على الرغم من أن الباحثين قد طوروا طرق حقن البويضة أساساً،لدراسة الكيفية التى تنشط وتخدم بها الجينات أثناء التطور الجنينى، إلا أنه يمكن استخدام

هذا النظام أيضا في إنتاج سلالات جديدة من الحيوانات الأليفة domestic animals. فإذا أمكن إدخال نسخ إضافية من جين هرمون النمو في الأبقار على سبيل المثال، فقد تنمو الحيوانات بصورة أسرع، كما هو الحال في الفئران، وربما تنتج مزيداً من الألبان، فالباحث برنستر من بين باحثين آخرين، حاول تجريب حقن بويضات الحيوانات الأليفة، التي تشمل الخنازير والأغنام والأبقار، بواسطة جين هرمون النمو، ويعتبر حقن بويضات هذه الحيوانات أكثر صعوبة من حقن بويضات الفئران، لأن بويضات الحيوانات الأليفة أكثر عتامة مما يجعل من الصعب رؤية النواة، وتوضح النتائج الأولية إن النسبة الصغيرة من الأغنام والخنازير التي تطورت من البويضات المحقونة بواسطة جين هرمون النمو البشري قد حملت الجين الغريب، في حين لم تنمو الحيوانات بطريقة أسرع من معدل النمو المعتاد.

وفيما يمكن تصويره، فإنه يمكن استخدام طرق حقن البويضة لإدخال جينات جديدة إلى الأجنة البشرية، ويمكن الحصول على البويضات المخصصة بطرق الإخصاب في المعمل (أطفال الأنابيب) التي تم تطويرها، لمساعدة الأزواج الذين لا يستطيعون الإنجاب بطريقة طبيعية، وبالرغم من ذلك، فلم يجرى التفكير في هذه التجارب بصورة جدية بسبب المشاكل العملية والأخلاقية التي تنجم عنها، السبب الأول، كان لحقن البويضة نسبة فشل عالية، ووفقاً لبرنستر، الذي قد يكون له خبرة أكبر في هذه التجارب عن أى باحث آخر، إن حوالى ١٠% تقريباً من الأجنة المحقونة أنتجت بالفعل ذرية حية، ولا يزيد على أكثر من ثلث هذه الحالات في أفضل الأحوال يحمل الجين المحقون.

السبب الثانى، لا يوجد حالياً طريقة للتحكم فى المكان الذى سيندمج فيه الجين الجديد داخل مجموعة العوامل الوراثية للخلايا المستقبلية للجين، وقد يؤدى الأمر إلى تأثيرات خطيرة إذا مزق الجين الجديد جيناً أساسياً. ويبرهن كلا من منتز وفرنستر على اقتراح بأن هذا يمكن أن يحدث، لكن المثال الأوضح قد جاء من معمل فيليب ليدر فى مدرسة هارفارد الطبية، فيبدو أنه وزملائى قد أعانوا تخليق عيب معروف فى أحد الأطراف النامية فى الفئران، فى إحدى تجاربهم لحقن البويضة.

لا يشكل هذا النوع من الطفر المقحم مشكلة إذا حدث أثناء نقل الجين إلى خلايا نخاع العظم، فى هذا النوع من النقل، تمتص العديد من الخلايا الجين الجديد وتنمجه بطريقة عشوائية فى الأماكن الكروموسومية، وإذا حدث أن مزق الجين المدخل (الجديد) جيناً فى بعض الخلايا، فربما تختفى هذه الخلايا أو لا تعمل بالصورة الصحيحة، فى حين لا يكون التأثير على المريض ملحوظاً، وإن احتمال حدوث تشوه متطور فى أحد أطراف شخص ما بسبب حقن البويضة، يعتبر حالة مختلفة تماماً.

وعلاوة على ذلك، فقد أوضح ليدر وفرنستر، أن فى إمكانهما تخليق فئران "لديها قابلية لتكون الورم"، عن طريق حقن الجينات فى البويضات المخصبة، وفى كلتا الحالتين، استخدمتا جينات لها إمكانية تسرطن معروفة، فى حين أن الـ د.ن.أ. الغريب يمكن أن يكون مسرطناً، حتى لو لم يكن يحتوى على مسرطن معروف، وكما ذكرنا من قبل، يمكن أن تسبب التكرارات الطرفية الطويلة الفيروسية بعض السرطانات فى الحيوانات، عند إدخالها بالقرب من مجموعة العوامل الوراثية الخلوية وتنشيطها لمولدات سرطان محتملة، ويعمل

الباحثون حالياً على تقليل إمكانية هذا الحدث، أثناء نقل الجين إلى الخلايا الجسدية، ولكن حتى إذا ثبت أن السرطان نتيجة نادرة للعلاج بالجين، فقد لا يكون من الضروري منع استخدامه في الأمراض الوراثية، التي كانت لها بالفعل وفاة مبكرة كنتيجة مؤكدة، والعديد من العقاقير المستخدمة لعلاج السرطان هي نفسها مسرطنة، غير أن الخطر يعتبر مقبولاً إذا كانت لها فرصة إنقاذ المرضى من مرض مهدد للحياة حالياً.

ويجب أن يطبق نفس المبدأ أيضاً على استخدام العلاج بالجين، في علاج الأمراض الوراثية المهلكة، بمجرد أن يتمكن الباحثون من التغلب على المشاكل التي يواجهونها في الحصول على تعبيرات مناسبة من الجينات المنقولة، وفي تلك الأثناء، تبرهن أساليب نقل الجين على فاعليتها كأدوات مفيدة لدراسة كيفية التحكم في تعبير الجين أثناء النمو، وربما تثبت فعاليتها أيضاً في تطوير سلالات جديدة من الحيوانات الأليفة.

الفصل السادس عشر

التكنولوجيا الحيوية والتنافس الدولي والاستراتيجيات التنظيمية Biotechnology, international competition and regulatory strategies

تواصل ثورة التكنولوجيا الحيوية انتشارها بسرعة في كافة أنحاء العالم، من الدول التي لها الريادة في هذا الحقل حالياً : الولايات المتحدة، واليابان، ودول غرب أوروبا، وسوف يعتمد نجاح كل دولة في تنافسها على تطوير وتسويق منتجات صناعاتها من التكنولوجيا الحيوية على عدة عوامل، وتشمل هذه العوامل، توفر رأس المال الخاص المستثمر، وقوة وضعف المؤسسات البحثية الأكاديمية، ودرجة التعاون بين الصناعة والبحث الأكاديمي وإسهامات الحكومة.

ويمكن أن تشمل الإسهامات الحكومية على كل من تقديم الدعم المباشر للبحث التكنولوجي الحيوي، وعلى تهيئة المناخ الذي يمكن تنمو فيه صناعات التكنولوجيا الحيوية وتتجج أو لا تتجج حسب الأحوال، وسيعتمد جزء كبير من هذا المناخ على سياسات الحكومة لتنظيم تطوير منتجات التكنولوجيا الحيوية، ويجب أن تحافظ الاستراتيجية التنظيمية المثالية على أمان البشرية والبيئة، دون إعاقة غير مناسبة لتطوير المنتجات الجديدة.

استراتيجيات دولية لتشجيع التكنولوجيا الحيوية

International strategies for fostering biotechnology

التكنولوجيا الحيوية فى اليابان

Biotechnology in Japan

يعد الالتزام المباشر للحكومة بالتكنولوجيا الحيوية، سمة تميز الجهد اليابانى لتشجيع الأهداف الناجحة لجهود تطوير التكنولوجيا فى تلك الدولة، ويتولى مسؤولية تنفيذ البرامج الحكومية فى اليابان : وكالة العلوم والتكنولوجيا Science and Technology Agency ووزارة الصناعة التجارة الخارجية Ministry of International Trade and Industry، ووزارة الزراعة والغابات والمصايد Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

وتشجع سياسات الحكومة اليابانية على التعاون بين الشركات الصناعية، التى تشمل مشروعات مشتركة بين اثنين أو أكثر من المؤسسات اليابانية وبين الشركات والبحث العلمى ، وقد جعلت الحكومة اليابانية من التكنولوجيا الحيوية هدفاً للتطوير، وقد خصص العمل من خلال مؤسسات يابانية كبيرة ومعترف بها، مصادر كبيرة من رؤوس الأموال من أجل تطبيقاتها التجارية.

وقد اختارت وزارة الصناعة التجارة الخارجية ثلاث مجالات كبرى من التكنولوجيا الحيوية لبرنامج تطوير وأبحاث مدته عشر سنوات، وسوف يركز البرنامج على تحسين أساليب استزراع كتلة الخلية، وتكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، وتطوير المفاعل الحيوى، وتعد المفاعلات الحيوية الفعالة، وهى الأوعية التى تصنع فيها منتجات التكنولوجيا الحيوية بواسطة كائنات مجهرية أو خلايا

أخرى وسيلة أساسية للانتقال الناجح من المعمل إلى الإنتاج التجارى لهذه المنتجات.

بالإضافة إلى ذلك، فقد أنشأت اليابان مؤسسة لأبحاث التكنولوجيا الحيوية والتنمية، تتكون من ١٤ شركة دوائية وكيميائية، وأعلنت وزارة الزراعة والغابات والمصايد أيضاً عن إقامة مركز تكنولوجيا حيوية لتشجيع البحث فى مجال التكنولوجيا الحيوية، ويعتبر العديد من هذه المبادرات التشجيعية، ثمار المجلس اليابانى للعلوم والتكنولوجيا Japanese Council for Science and Technology الذى تولى رئاسته بنفسه رئيس الوزراء ناكاسونى ، وقد أعلن المجلس أن الحكومة اليابانية تضع التكنولوجيا الحيوية على قمة أولوياتها .

وبمقارنة الموقف فى الولايات المتحدة ، الذى يوجه معظم التمويل الحكومى إلى الأبحاث الأساسية، فإن التمويل الحكومى فى اليابان يوجه بصفة أساسية إلى البحث التطبيقى، ويركز بشكل أكبر على مشروعات معينة، ونتيجة لذلك، يتوفر لدى الولايات المتحدة عدد كبير من العلماء للقيام بالأبحاث الأساسية، لكنها تفتقر إلى مهندسى التشغيل الحيوى وبرنامج تدريبهم، ويستهدف عمل هندسة التشغيل الحيوى حل المشاكل المتعلقة برفع نسب scaling-up مقادير صغيرة من المواد التى تصنع من خلال العمليات المعملية إلى مقادير كبيرة جداً، تنتج بمقادير تجارية حتى تكون مجدية اقتصادياً.

ومشكلة اليابان هى عكس مشكلة الولايات المتحدة، فلدى اليابان عدد كبير من مهندسى التشغيل الحيوى، فى حين تفتقر إلى الأعداد الكافية من العلماء المدربين فى مجال الوراثة الجزيئية molecular genetics، ونتيجة لذلك، تعتبر

اليابان فى الوقت الراهن ، الدولة الرائدة فى العالم فى تكنولوجيا التخمير والتصنيع الميكروبي لسلع كيميائية مثل، الأحماض الأمينية، وهو المجال الذى قد تسهم فيه التكنولوجيا الحيوية من أجل تخفيض تكاليفه، ولكن فى مجالات مثل استزراع الخلية الثديية mammalian cell culture وهندسة البروتين protein engineering، فإن اليابان تعتبر فى المرتبة الثانية بعد الولايات المتحدة، ويجب أن تزيد دعمها فى مجال التدريب والأبحاث والتنمية، إذا ما رغبت فى التنافس.

أساليب عمل أوروبية لتشجيع التكنولوجيا الحيوية **European approaches to fostering biotechnology**

إحدى نتائج ثورة التكنولوجيا الحيوية فى الولايات المتحدة، إنشاء العديد من الشركات الصغيرة، التى تهدف بشكل محدد إلى استغلال أحدث التطورات فى أبحاث الوراثة الجزيئية والجسم المضاد أحادى الاستساخ، ووفقاً لدراسة أجرتها أخبار الهندسة الوراثية فى عام ١٩٨٤، وجدت أن لدى حوالى ثلاثمائة شركة أمريكية معظمها من الشركات الجديدة والصغيرة، برامج تكنولوجيا حيوية كبيرة، وعلى عكس الولايات المتحدة، تعاني أوروبا من نقص رأس المال المستثمر واللازم لإقامة هذه العمليات، ونتيجة لذلك، يأتى التمويل الأساسى للمعامل الأوروبية للقيام بأبحاث التكنولوجيا الحيوية من المؤسسات الصناعية التقليدية والمؤسسات التمويلية والحكومات العديدة.

ويمكن للشركات الأوروبية الكبرى، التى تعمل بنظام الشركات متعددة الجنسيات ولها مصادر تمويلية كبيرة أن تتسق جهودها مع المجموعات الأخرى فى العالم، وعلى سبيل المثال، قدمت شركة هوكست للأدوية والمواد الكيميائية

فى ألمانيا منحة لجامعة هارفارد والمستشفى العام بماساشوسيتس فى بوسطن بأمريكا بمبلغ مائة مليون دولار للقيام بالأبحاث الأساسية فى مجال البيولوجيا الجزيئية، وقامت بتدريب العلماء فى شركتها، ولشركة هوكست أيضاً مشروعات تعاونية مع كل من الشركات الأمريكية والبريطانية واليابانية.

وتقوم الحكومات الأوروبية بتطوير استراتيجياتها الخاصة لتشجيع المشروعات الناجحة فى التكنولوجيا الحيوية، وتشمل هذه الاستراتيجيات بصفة أساسية، تقديم الدعم إلى شركات التكنولوجيا الحيوية الجديدة، والمشروعات الكبرى ذات الأساس التعاونى، وإلى البرامج الأكاديمية فى التكنولوجيا الحيوية، وإلى التعاونيات الصناعية العديدة، وتهدف المشروعات التى تكفلها الحكومات الأوروبية، مثل المشروعات القائمة فى اليابان إلى التركيز على الأبحاث التطبيقية بدلاً من الأبحاث الأساسية.

ويأتى مصدر التمويل العام للتكنولوجيا الحيوية فى المملكة المتحدة من عدة مصادر مختلفة، تضم من بينها هيئة التجارة والصناعة Department of Trade and Industry، ومجلس أبحاث العلوم والهندسة Science and Engineering Research Council، ومجلس الأبحاث الطبية Medical Research Council. وتعتبر مجموعة التكنولوجيا البريطانية، من المؤسسات العامة التى أنشأت من أجل المساعدة على نقل الأبحاث الأساسية فى التكنولوجيا الحيوية إلى الاستغلال التجارى، ومن بين مشروعاتها الأخرى، مساعدتها على دعم تكنولوجيا الخلية Celltech، وهى مؤسسة صغيرة متخصصة فى مجال تكنولوجيا الجسم المضاد أحادى الاستنساخ.

وفى ألمانيا، تدعم الوزارة الفيدرالية للأبحاث والتكنولوجيا تطوير التكنولوجيا الحيوية الأساسية، وتشجع على نقل التكنولوجيا الحيوية إلى مجال الصناعة، وتقدم الوزارة أيضاً منحاً للمعامل الحكومية والجامعات والمعاهد، والتي من بينها معهد ماكس بلانك Max Planck Institute. وجمعية البحث التكنولوجي الحيوي The Society for Biotechnological Research، وهو معمل حكومي يعد من أفضل المراكز البحثية في التكنولوجيا الحيوية في أوروبا، يعتبر مؤسسة أخرى تهتم بنقل التكنولوجيا الحيوية إلى التطبيق التجاري.

ويقدم التمويل الحكومي الفرنسي لمجال التكنولوجيا الحيوية من خلال وزارة الأبحاث والصناعة، ومعاهد حكومية مثل، معهد أبحاث الصناعة، بالإضافة إلى ذلك، يقوم المركز القومي للأبحاث العلمية ومعهد الصحة والأبحاث الطبية بإنشاء برامج في البيولوجيا الجزيئية، قد تَوَتى بثمارها في صناعة التكنولوجيا الحيوية. وتولى الحكومة الفرنسية اهتماماً كبيراً للتكنولوجيا الحيوية، إذ تستهدف الإسهام بحصة ١٠% من السوق العالمي للتكنولوجيا الحيوية بحلول عام ١٩٩٠، ومع ذلك، فقد تأتى فرنسا بعد الولايات المتحدة واليابان وبعض الدول الأوروبية الأخرى في التطور التجاري الشامل للتكنولوجيا الحيوية.

وأنشأت هولندا مؤخراً سلسلة من "البرامج الجديدة الموجهة للأبحاث" التي تدعمها وزارتان هما: وزارة الشؤون الاقتصادية ووزارة التعليم والعلوم، ويخصص أحد هذه البرامج للتكنولوجيا الحيوية، حيث يركز على الأبحاث الأساسية والتطبيقية في الجامعات والمعاهد البحثية التي لا تسعى للربح non-profit-making research institutes، وتقوم بتوجيهه وتمويله وزارة الشؤون الاقتصادية، ولبرنامج التكنولوجيا الحيوية أربعة أقسام فرعية، ويهتم كل واحد

منها بالتصنيع والرعاية الصحية والزراعة والبيئة. وتتسم أبحاث التكنولوجيا الحيوية في الجامعات الهولندية بأسلوب انضباطي متعدد على المشروعات التطبيقية، مع إشراك بعض الجامعات في برامج مشتركة، وتدعم الأبحاث بمنح حكومية وعقود فردية من الحكومة والصناعة، وقد أقامت الجامعات بالفعل العديد من المشروعات التجارية الصغيرة لتسويق منتجات أبحاثها. وللجامعات أيضاً خطط لتقديم برامج تعليمية جديدة في مجال التكنولوجيا الحيوية، وتركز أنشطة التكنولوجيا الحيوية الصناعية في شركات كبيرة متعددة الجنسية، تهتم بصفة عامة بتطبيقات البحث العلمي على خطوط الإنتاج.

ولا توجد لدى سويسرا، التي لديها أعلى دخل للفرد من بين الدول الصناعية سياسة حكومية لتشجيع التكنولوجيا الحيوية، فالعلوم السويسرية ليست مركزية بدرجة كبيرة، حيث تتم معظم الأبحاث والتنمية في الصناعة، والشركات السويسرية، بالإضافة إلى وجود برامجها التعاونية، فإنها تدعم البحث الأساسي في المعاهد الخاصة، وتشجع الجامعات على التركيز على الأبحاث الأساسية والتعليم. وتدعم الحكومة السويسرية معهدين فيدراليين للأبحاث، أحدهما في زيورخ والآخر في لوزان، في حين يوجه معظم تمويل الأبحاث إلى جامعات الولايات، التي تتلقى أيضاً تمويلاً بحثياً كبيراً من حكومات المقاطعات .

وبالإضافة إلى المبادرات التشجيعية الفردية، تعمل الدول الأوروبية مجتمعة بعدد من الطرق لكي تتنافس بصورة أكثر فاعلية الولايات المتحدة واليابان، ففي عام ١٩٨٢، بدأت مفوضية الجماعة الأوروبية Commission of the European Communities برنامج هندسة حيوية جزيئية لمدة خمس سنوات الذي أنفق حوالى خمسة عشر مليوناً من الدولارات على مائة عقد لمشروعات بحثية متخصصة ،

ومن المفوضيات الأخرى المعنية، مفوضية مشروع معلومات التكنولوجيا الحيوية الأوربي، الذي يسهل تبادل المعلومات التكنولوجية الحيوية في أوروبا.

وتشمل المنظمات التعاونية الأخرى المهمة بالتكنولوجيا الحيوية، الاتحاد الفيدرالي الأوروبي للتكنولوجيا الحيوية European Federation of Biotechnology، الذي يعقد المؤتمرات والآليات الأخرى، التي تعمل على إنجاح أنشطة النظم الانضباطية المتبادلة في مجال التكنولوجيا الحيوية، ومنظمة البيولوجيا الجزيئية الأوروبية، التي تشجع البحث الأساسي ونقل المعلومات في مجال البيولوجيا الجزيئية.

وقد اتخذت المجموعة الاقتصادية الأوروبية ECC خطوات لحفز كل من البحث الأساسي والتطبيقي في تكنولوجيات عديدة، ويشير آخر تقارير المجموعة الاقتصادية الأوروبية، إلى أن التطبيقات العملية في مجال التكنولوجيا الحيوية تتأخر حالياً نتيجة قصور النظر في الفسيولوجيا الميكروبية، وتحدد مجالات بحثية سيعتمد عليها التقدم في المستقبل، وتشمل هذه المجالات فسيولوجيا الكائنات العضوية من بيئات غير عادية، وتعديل البروتينات، وتنظيم دورة الخلية، والكائنات المجهرية المجمدة لإنتاج بروتينات مهندسة وراثياً، ويخرج التقرير بنتيجة أن هناك نقص على المستوى العالمي في أعداد المختصين المؤهلين بدرجة كبيرة للاطلاع بهذه المهام، والذي ستكون نتيجته خلق عراقيل أمام التجديد في مجال التكنولوجيا الحيوية، خصوصاً في أمريكا الشمالية وبدرجة أقل في أوروبا واليابان.

وعلى الرغم من الجهود التعاونية للمجموعة الاقتصادية الأوروبية ومفوضية المجموعة الأوروبية، فيجب على أوروبا القيام بالكثير لمسايرة التقدم مع اليابان والولايات المتحدة في التطوير والتطبيق الصناعي للتكنولوجيا الحيوية، وعلى سبيل المثال، يجب إعادة تنظيم الإدارة الأوروبية والعمل والحكومات للإعداد لتطورات تكنولوجية حيوية جديدة.

وهناك جهد مكثف يجب أن يبذل أيضا للتغلب على بعض المشاكل الأخرى التي قد تعوق التطور التكنولوجي الحيوي في أوروبا، وتشمل هذه المشاكل تنحية الشركات الأوروبية من المنافسة، ومعدلات الضرائب الهامشية العالية، التي تحد من استثمار رؤوس الأموال، والقوانين المتشددة، والتنظيم الزائد عن الحد، ومع ذلك، وكما ذكر مارك ديبنر Mark Dibner، في استعراض للجهود الأوروبية في مجال التكنولوجيا الحيوية، أنه يجب على أوروبا ألا تخطئ التقدير، فإذا نجحت جهود المجموعة الاقتصادية الأوروبية والجهود القومية في التنسيق والدعم، فسوف يكون للصناعات الأوروبية تواجد نشط في أسواق التكنولوجيا الحيوية العالمية.

استراتيجيات الولايات المتحدة من أجل أبحاث وتطوير

التكنولوجيا الحيوية

US strategies for biotechnology research and development

كيف يمكن للولايات المتحدة، التي احتلت لفترة طويلة موقعاً ريادياً في مجال أبحاث وتنمية التكنولوجيا الحيوية، الاستمرار في إحراز الابتكارات التكنولوجية

المطلوبة لنمو وتطور اقتصادى قوى؟ ناقشت العديد من الدراسات المتكاملة هـ الموضوع بشكل محدد فى الآونة الأخيرة، وأكدت التقارير على أهمية الاستثمار الحكومى فى الأبحاث الأساسية، وطالبت أيضاً باهتمام متزايد من الحكومـة والبحث العلمى والصناعة، لإيجاد أفضل الوسائل للتشجيع على نقل التكنولوجيا. وقدمت التوصيات التى تضمنتها التقارير، استراتيجية لتشجيع التطور الصناعى للتكنولوجيا الحيوية ومواجهة تحديات التنافس الدولى.

لجنة الرئيس للتنافس الصناعى

President's Commission on Industrial Competitiveness

فى يونيه عام ١٩٨٣، أنشأت لجنة الرئيس للتنافس الصناعى، التى تتشكل فى أغلبها من كبار الموظفين التنفيذيين لشركات التكنولوجيا العالية، لتقديم المشورة للصناعة الأمريكية والحكومة عن السياسات الحكومية بشأن التنافس الدولى. وبعد إنشاء اللجنة بثمانية عشر شهراً، أعلنت عن تقرير منافسة عالمى "الحقيقة الجديدة" The New Reality، الذى يوصى بزيادة الدعم الحكومى للأبحاث الجامعية، والأبحاث المتعلقة بتكنولوجيات التصنيع الابتكارى، وأوصى التقرير أيضاً بصفة خاصة بائتمان ضريبي جديد حتى تشجع الصناعة على القيام بالمزيد من الاستثمار فى الأبحاث الجامعية.

وتبعاً للبيانات التى جمعتها وأعدتها مؤسسة العلوم القومية (NSF)، فقد بلغ إنفاق الولايات المتحدة على الأبحاث والتنمية (R&D) مائة واثنين وعشرين مليارات من الدولارات فى عام ١٩٨٦، بلغ ما قدمته منه الحكومة الفيدرالية حوالى ثلاثة وخمسين مليارات من الدولارات ، وعلى مدى الخمس سنوات الماضية، كانت

تتركز الزيادات فى الدعم الحكومى للأبحاث والتنمية فى مجالات الأبحاث الأساسية والحماية ، وتلقت حماية الأبحاث والتنمية فى عام ١٩٨٦ مبلغ سبعة وثلاثين بليوناً من الدولارات -وهى تمثل ٧٠% من أجمالى النفقات الفيدرالية على الأبحاث والتنمية - وتلقت أبحاث الصحة خمسة ونصف بليون من الدولارات.

ووجدت اللجنة الرئاسية أن الدعم الفيدرالى للأبحاث والتنمية فى القطاع المدنى مشتباً بدرجة كبيرة ويفتقر إلى التنسيق الملائم ، وللتغلب على هذه المشاكل، اقترح تقرير اللجنة أن تتضمن جميع وكالات الأبحاث والتنمية المدنية فى دائرة علوم وتكنولوجيا ذات مستوى وزارى واحد، إلا أن هذا الاقتراح لا يحتمل الأخذ به، لأنه قد يتطلب إعادة تنظيم كبير للبرامج الفيدرالية للأبحاث والتنمية وسوف يتطلب إجراء دستورى لتغيير الهيئات الدستورية المرتبطة بها، وامتدح التقرير أيضاً المبادرات التشجيعية للولايات والأقاليم لتشجيعها على التعاون بين الحكومة والجامعات والصناعة، عن طريق برامج التنمية الاقتصادية والمالية.

مكتب الميزانية التابع للكونجرس

Congressional Budget Office

فى يونية عام ١٩٨٥، أصدر مكتب الميزانية التابع للكونجرس (CBO) تقريراً بعنوان "الدعم المالى الفيدرالى لصناعات التكنولوجيا المتقدمة"، وقد نبه هذا التقرير من اهتمام الكونجرس بالتحدى الدولى المتزايد للتكنولوجيا الأمريكية، والذى تدعمه معظمه الحكومات الأجنبية، وذكر التقرير أن الكونجرس

حاول التقليل من تكاليف الأبحاث والتنمية الخاصة، عن طريق توحيد سياسة ضريبية ، وإنفاق مباشر وتشريع براءات الاختراع.

ويقدم تقرير مكتب الميزانية التابع للكونجرس مثل تقرير اللجنة الرئاسية خيارات للائتمان الضريبي، لحفز الصناعة على القيام بأبحاث التكنولوجيا المتقدمة، ومجموعة القوانين الضريبية التي أقرها الكونجرس في سبتمبر عام ١٩٨٦، تواصل الائتمان الضريبي للأبحاث والتنمية للصناعة، بالرغم من أنها تقلصت من ٢٥% إلى ٢٠%، في مقابل الزيادات في الإنفاق على الأبحاث والتنمية، بالإضافة إلى ذلك، تضمن مشروع القانون ائتمان ضريبي جديد قدره ٢٠%، لاعتمادات جديدة تنفقها الصناعة على الأبحاث والتنمية في الجامعات.

ويقترح التقرير أيضا خيارات للدعم الفيدرالي المباشر للأبحاث والتنمية الصناعية، وسوف تقدم إحدى آليات التمويل المقترحة منح بواسطة وكالات مثل مؤسسة العلوم القومية من أجل البحث التطبيقي للمصلحة العامة بصناعات التكنولوجيا المتقدمة، وهناك خيار آخر، لتمويل مشروعات متخصصة بشكل مباشر. وهناك خيار ثالث، سيجعل الحكومة الفيدرالية تشتري الأبحاث والتنمية كما فعلت دائرة الحماية لمساعدة صناعة أشباه الموصلات الأمريكية.

مكتب تقييم التكنولوجيا

Office of Technology Assessment

أنشأ الكونجرس الأمريكي مكتب تقييم التكنولوجيا (OTA) في عام ١٩٧٢، لتزويد المشورة في مجال العلوم والتكنولوجيا، ويقترح آخر تقارير مكتب تقييم

لتكنولوجيا "التكنولوجيا الحيوية التجارية-تحليل دولي"، أن الدعم الحكومي للأبحاث وللتدريب على النظم العلمية المتعلقة بالتكنولوجيا الحيوية، كان مهماً جداً لجعل الولايات المتحدة تحتفظ بموقع الصدارة في مجال التكنولوجيا الحيوية. ويؤكد تقرير مكتب تقييم التكنولوجيا على الحاجة إلى تمويل البحث في تكنولوجيات التخمر وللتدريب الطلاب على عمليات الهندسة الحيوية، وهي المجالات التي كما ذكرنا من قبل، تفتقر إليها الولايات المتحدة، وخصوصاً بالنسبة لتنافسها مع اليابان، ويضيف التقرير توصيات أخرى، بأنه يجب على الحكومة أن تمويل البحث التطبيقي لتصميم المفاعل الحيوي ولتمويل بيولوجيا الكائنات المجهرية المفيدة لصنع منتجات صناعية، وهناك توصية أخرى لمكتب تقييم التكنولوجيا تتعلق الدعم المتزايد للمزيد من الدراسات الأساسية في البيولوجيا الجزيئية، وخصوصاً البيولوجيا الجزيئية للنبات.

الأكاديمية القومية للعلوم

The National Academy of Science

تعمل الأكاديمية القومية للعلوم (NAS) من خلال عضويتها المتكونة من علماء الولايات المتحدة البارزين كاستشاري مستقل للحكومة الفيدرالية، وأصدرت الأكاديمية القومية للعلوم في عام ١٩٨٤، تقرير موجز هيئة مستشاري الأبحاث للعمليات الهندسية والكيميائية للتكنولوجيا الحيوية، الذي يشير أيضاً إلى الحاجة تقوية القاعدة المعرفية لهندسة العمليات الحيوية في الولايات المتحدة، ويذكر التقرير، أنه بدون هذه القاعدة، فلن تصبح الولايات المتحدة قادرة على الاحتفاظ بدور الريادة في مجال التكنولوجيا الحيوية.

وعلى الرغم من هذه الحوافز ، فإن أقل من عشرين جامعة أمريكية تعمل حالياً فى برامج متعلقة بالهندسة الكيميائية الحيوية، ولم تخرج البرامج أكثر من ستين خريجاً سنوياً ممن يحملون درجة الدكتوراه أو الماجستير ،برغم حاجة الولايات المتحدة إلى نحو ضعف إلى ثلاثة أمثال هذا العدد، وفى المقابل،دعمت كل من ألمانيا واليابان والمملكة المتحدة، معاهد التكنولوجيا الحيوية فيدرالياً،من خلال ميزانيات تشغيل ضخمة، التى جمعت الباحثين الأكاديميين والصناعيين من أجل الأبحاث التنظيمية المتبادلة، ولا توجد حتى الآن معاهد مشابهة لها فى الولايات المتحدة.

وتبعاً لذلك،تتضمن الأهداف التى أوصت بها هيئة المستشارين التابعة للأكاديمية القومية للعلوم زيادة القدرات الهندسية لتصميم نظم لزراعة كميات كبيرة من الخلايا البكتيرية والنباتية والحيوانية، وتوسيع القاعدة المعرفية المطلوبة لاستخلاص وتنقية كميات كبيرة من الجزيئات البيولوجية، وتدريب الجيل القادم من مهندسى الكيمياء الحيوية.

وبالمثل، طالبت الأكاديمية القومية للهندسة فى عام ١٩٨٤،بتأسيس خمسة وعشرين مركزاً للأبحاث الهندسية بتكلفة تصل إلى خمسة وعشرين مليوناً دولار للمركز الواحد،و تقوم مؤسسة العلوم القومية بتحمل نفقاتها، وقد تم حتى الآن الانتهاء من إنشاء أحد عشر مركزاً، تضم مركزاً لأبحاث هندسة عمليات التكنولوجيا الحيوية فى معهد ماساشوستس للتكنولوجيا(MIT)فى كمبردج، ويضم مركز التكنولوجيا الحيوية،الذى يقوم بالإشراف عليه دانييل .أ.وانج Daniel E. Wang الأبحاث الأساسية فى بيولوجيا الخلية، والبيولوجيا الجزيئية مع البحث التطبيقي فى الهندسة الكيميائية.

بالإضافة إلى ذلك، فقد أكدت هيئة مستشارى الأكاديمية القومية للعلوم المختصة بالتكنولوجيا الحيوية فى مجال الزراعة، على أهمية الهندسة الوراثية فى الزراعة، ويؤكد تقرير موجز هيئة مستشارى الأبحاث للعمليات الهندسية والكيميائية للتكنولوجيا الحيوية على الحاجة إلى الأبحاث على نطاق واسع فى موضوعات، تتراوح ما بين زيادة نوعية الإنتاج الغذائى وكفاءته إلى تحسين الحماية ضد الآفات العضوية، وتشمل توصيات هيئة المستشارين زيادة تمويل الأبحاث الزراعية فى الوكالات القائمة، والتي من بينها هيئة الزراعة الأمريكية، ومؤسسة العلوم القومية، والمعاهد القومية للصحة NIH، وهيئة الطاقة.

ويطالب التقرير أيضاً بتقديم منح خاصة قصيرة الأجل لمدة تتراوح ما بين خمس إلى عشر سنوات، للمساعدة على دمج طرق جزيئية تضم نظم أكاديمية أو علمية فى البيولوجيا الزراعية الأساسية والتطبيقية، وعلاوة على ذلك، تقترح هيئة المستشارين توسيع نطاق منح التدريب للعلماء الشبان، وزيادة مكافآت تطوير المهنة للباحثين الشبان الحاليين، وتمويل منح لتقديم إجابات عن مسائل التنظيم الكيميائى الحيوى والفسىولوجى، وتوفير مصادر للحفاظ على الأصول الوراثية النباتية، وتضيف هيئة الاستشاريين، إن الحاجة إلى قيادة ديناميكية فى تطبيق التكنولوجيا الحيوية، يمكن تتوفر من خلال إنشاء منصب مدير علمى متفرغ فى مكتب مصلحة الزراعة للمنح ونظم البرامج .

مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا

Office of Science and Technology Policy

تأسس مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا (OSTP) فى عام ١٩٦٢، ويهدف إلى تقديم المشورة إلى جهاز الحكومة التنفيذى المعنى بالعلوم والتكنولوجيا، وقد

قدم توصياته للإستراتيجيات المتعلقة بتشجيع التكنولوجيا الحيوية، التى بنيت على أساس تقارير مكتب تقييم التكنولوجيا ومؤسسة العلوم القومية. وقد لعب جورج أ. كيوراث A. Keyworth, II George المدير السابق لمكتب علوم وسياسة التكنولوجيا دوراً كبيراً فى إقامة مراكز الأبحاث الهندسية لمؤسسة العلوم القومية ، واقترح كيوراث و انريك بلوك، مدير مؤسسة العلوم القومية تخصيص مبلغ خمسمائة مليون دولار على مدى عدة سنوات من أجل المراكز البحثية. وفى عام ١٩٨٥، أنشئت ستة مراكز، خصص إحداها لأبحاث التكنولوجيا الحيوية. وأنشأت خمسة مراكز أخرى فى عام ١٩٨٦ بالرغم من أنه لم يخصص أى منها للتكنولوجيا الحيوية، وقد أنشأت ثلاثة أو أربعة مراكز أخرى فى عام ١٩٨٧.

وعلاوة على ذلك، يهتم مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا بتطبيق التكنولوجيا الحيوية فى مجال الاحتياجات المتطورة للزراعة، واقترح المكتب أن تقوم مؤسسة العلوم القومية، وهيئة الزراعة والطاقة بتمويل العديد من المراكز الفيدرالية للقيام بالأبحاث فى مجال الزراعة والتكنولوجيا الحيوية، وسوف تتمق مشروعات المراكز من خلال مراكز التى تضم نظم علمية أو أكاديمية فى الجامعات، وسوف يضيف برنامج الدعم، الذى سيكون متاحاً لخمس سنوات مبلغ ٢٥٠ مليون دولار، لمجموعة المنح التنافسية للتكنولوجيا الحيوية النباتية، ويركز البحث المقام فى هذه المراكز على مجالات تتراوح ما بين المقاومة البيولوجية للآفات الزراعية إلى الحفاظ على نوعية المياه، وسيتوفر أيضاً الأموال المخصصة لتدريب علماء ما بعد مرحلة الدكتوراه فى أبحاث النبات التى تضد نظم علمية أو أكاديمية .

وسيطّل الالتزام بتنفيذ هذه البرامج سارياً على الرغم من تخفيض الميزانيات التي خولها قانون Gramm-Rudman-Hollings، وأقرها الكونجرس الأمريكي في عام ١٩٨٥، في محاولة لضبط العجز المتزايد في الميزانية. وقد ألقى جون ب. مكتاجو، John P. McTague المدير التنفيذي في ذلك الحين لمكتب علوم وسياسة التكنولوجيا بشهادة أمام الكونجرس في عام ١٩٨٦، ذكر فيها "إننا نطالب بصورة حثيثة بمبادرة لإقامة نظم انضباط متعددة تنبثق من الجامعة، ومراكز علوم وتكنولوجيا بشأن المجالات الضرورية للاحتياجات القومية العريضة والمتعلقة بالتكنولوجيا الصناعية".

ويعتبر مكتاجو أن برنامج مراكز الأبحاث الهندسية لمؤسسة العلوم القومية نموذج عمل جيد للمراكز البحثية المقترحة للتكنولوجيا الحيوية الزراعية، وذكر أن بدء خطط المراكز الهندسية بداية طبية، لكنها مجرد بداية، فهذا المفهوم يستحق المحاكاة عبر المنظومة الشاملة لنظم الانضباط المتبادلة في العلوم والرياضيات والهندسة، وسوف تكون هناك مراكز نظم متبادلة جديدة مختصة بهندسة العمليات الحيوية والزراعة والطاقة والبيئة، والتي ستطور في غضون خمس سنوات، ويجب أن تساعد هذه المراكز على تضافر جهود الحكومة والجامعة والصناعة، من أجل تشجيع التطبيقات الصناعية للتكنولوجيا الحيوية.

المعاهد القومية للصحة

The National Institutes of Health

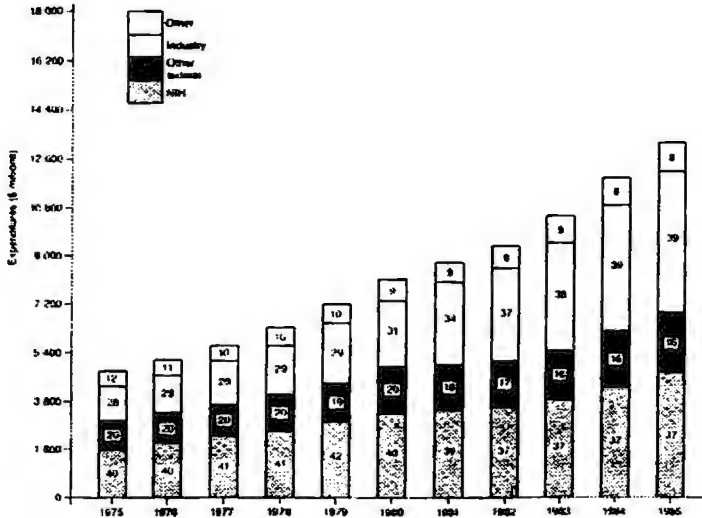
انخفضت نسب الاعتمادات التي أسهمت بها الحكومة الفيدرالية لدعم الأبحاث الطبية الحيوية بدرجة طفيفة خلال العقد السابق، كما انخفض الدعم الذي أسهمت

به المنظمات التي لا تسعى للربح non-profit-making (شكل ١٦-١)، وفي تلك الأثناء أصبحت الأبحاث التي تقوم به الصناعة مهما بصورة متزايدة. وتقوم المساهمات التي تقدمها الصناعة حالياً، بالإسهامات التي تقدمها المعاهد القومية للصحة (NIH)، وهي الوكالة الحكومية المختصة بمسؤولية كبرى في القيام بتمويل وأداء البحث الطبي الحيوى.

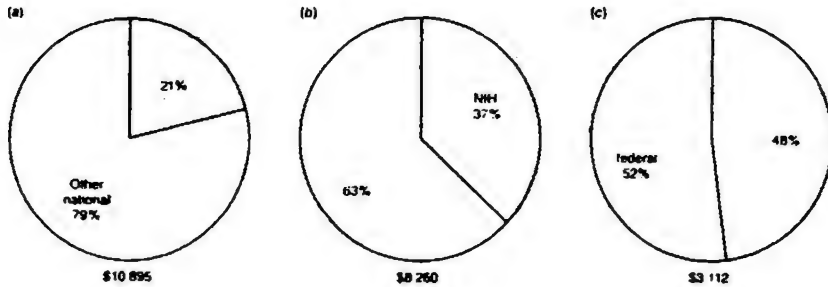
وعلى الرغم من ذلك، تواصل المعاهد القومية للصحة جهودها لتصبح الوكالة الأمريكية الرائدة التي تدعم الأبحاث الأساسية، ففي السنة المالية عام ١٩٨٣، أسهمت العاهد القومية للصحة بنسبة ٢١% من كل الدعم القومى للأبحاث الأساسية، وبنسبة ٤٨% من التمويل الفيدرالى للأبحاث الأساسية فى الجامعات والكليات (شكل ١٦-٢). وللمعاهد القومية للصحة أيضاً الدور الفيدرالى الكبير، فى دعم التكنولوجيا الحيوية فى مجال الأبحاث والتنمية (جدول ١٦-١).

وقد بدأت المعاهد القومية للصحة فى مراجعة رسالتها، لتحديد ما إذا كانت هناك اتجاهات جديدة مطلوبة فى مساهماتها لأبحاث وتنمية التكنولوجيا الحيوية فى الصناعة ومجال النشاط والبحث المتعلق بالتعليم فى الكليات والجامعات . وذكر جيمس وايجاردن James Wyngaarden مدير المعهد، أن المعاهد القومية للصحة سوف تختبر دورها فى كفاءتها لنوع البحث التطبيقى الذى اعتبره واقعاً بين البحث الأساسى، التي كانت تدعمه المعاهد القومية للصحة بصورة تقليدية والبحث الاحتكارى، الذى تقوم به الصناعة لتطوير منتجات معينة، وسوف تركز أيضاً القوة المنتدبة المتمثلة فى القيام بمراجعة شاملة لأنشطة المعاهد

القومية للصحة فى مجال التكنولوجيا الحيوية على البحث والتدريب المطلوبين لزيادة الخبرة القومية فى جميع المجالات الكبرى فى صناعة التكنولوجيا الحيوية.



شكل ١٦ - ١ الدعم القومى لأبحاث وتنمية الصحة فى الولايات المتحدة من عام ١٩٧٥ إلى عام ١٩٨٥، الأرقام الموجودة بالأعمدة هى نسب مئوية، فخلال هذا العقد، انخفضت نسب الاعتمادات التى ساهمت بها المعاهد القومية للصحة (NIH) والوكالات الفيدرالية الأخرى بدرجة طفيفة، كما حدث انخفاض أيضا فى نسب اعتمادات المؤسسات والمنظمات التى لا تستهدف الربح ('الأخرى'). وفى تلك الأثناء، توسعت الصناعات من دعمها للأبحاث والتنمية فى مجال الصحة.



شكل ١٦ - ٢ دعم المعاهد القومية للصحة فى الولايات المتحدة للأبحاث الأساسية فى السنة المالية ١٩٨٣، وتعتبر المعاهد القومية للصحة الوكالة الرائدة فى الولايات المتحدة التى تقدم الاعتمادات للأبحاث الأساسية، حيث تساهم بنسبة ٢١% من التمويل الحكومى للولايات المتحدة التى تتلقاه فى هذا الغرض فى السنة المالية ١٩٨٣ (b) ٣٧% من الأموال التى أنفقها الحكومة الفيدرالية (b). وعلاوة على ذلك، يبقى حوالى نصف الدعم الفيدرالى للأبحاث الأساسية فى الكليات والجامعات من المعاهد القومية للصحة (c). والأرقام الموجودة أسفل الدوائر تعين أجمالى النفقات فى هذه الفئات بالمليون دولار.

جدول ١٦-١ أبحاث التكنولوجيا الحيوية (a) التي تمويلها الحكومة الفيدرالية في الولايات المتحدة في السنوات المالية من ١٩٨٤ إلى ١٩٨٧.

	Amount of funding (millions of dollars)b			
	1984	1958	1986 (est.)	1987 (budget est.)
National Institutes of Health	1633	1839	1836	1801
Directly related ^c	521	639	636	621
Broader science base ^d	1112	1200	1200	1180
National Science Foundation	61	82	89	109
Department of Agriculture	39	77	74	79
Department of Energy	38	43	43	44
Department of Defense	33	34	43	49
Army	24	22	28	31
Office of Naval Research	9	12	15	18
Department of Commerce/ National Bureau of Standards	1	1	3	4
Environmental Protection Agency	0	2	6	8
Total	1805	2078	2094	2094

a من أجل هذا التحليل، استخدم تعريف مكتب تقييم التكنولوجيا للتكنولوجيا الحيوية تشمل التكنولوجيا الحيوية أي أسلوب يستخدم الكائنات الحية (أو أجزاء من الكائنات الحية) لتصنيع أو تعديل المنتجات، أو لتحسين النباتات أو الحيوانات، أو لتطوير كائنات الحية الدقيقة لاستخدامات معينة.

b مقربة إلى أقرب مليون.

c تحدد NIH الأبحاث المرتبطة بصورة مباشرة، بأنها الأبحاث المتضمنة على المعالجة الوراثية واستمساخ الـ د.ن. أو استخدام الأساليب الخاصة بعزل أو الكشف عن الـ د.ن. أو خلق الأورام المهجنة وإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستمساخ بالطرق الكمبيوترية المستخدمة في تحليل تسلسلات الـ د.ن. أ. والبروتين.

d تشير قاعدة العلوم المربطة إلى البحث المتضمن على التكنولوجيا الحيوية الجديدة ويشمل الاختبارات واسعة النطاق في الورقة والبيولوجيا الجزيئية وبيولوجيا الخلية والمناعة.

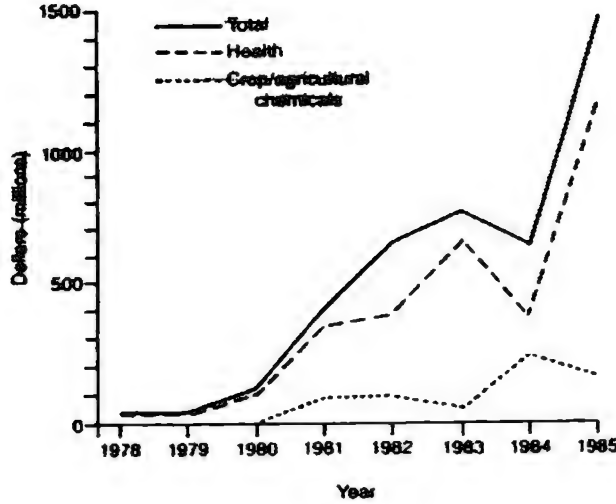
ملحوظة : الميزانيات في عام ١٩٨٦ و ١٩٨٧ ميزانيات تقديرية.

المصدر تم الحصول على هذه البيانات من مكتب البيت الأبيض للعلوم والسياسة التكنولوجية ومن مسؤولي برامج التكنولوجيا الحيوية في كل من المصالح والوكالات المعنية.

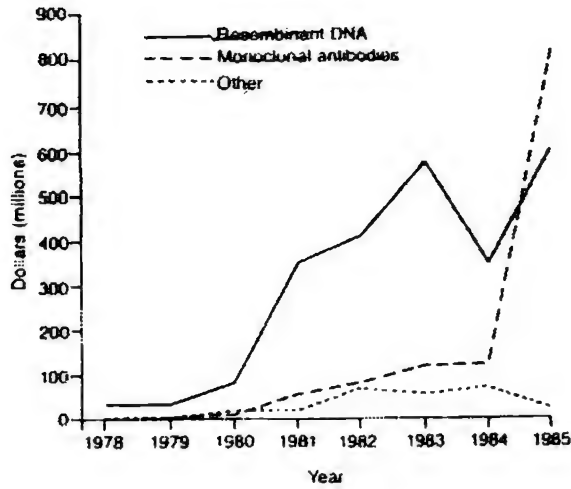
دور الصناعة

The role of industry

بلغ الاستثمار التراكمى للقطاع الخاص فى مجال التكنولوجيا الحيوية مع نهاية عام ١٩٨٥، اجمالى يزيد قليلاً عن ٤ مليارات دولار، بنسبة ٦٥% مأخوذة من مشتريات حقوق المساهمين، و ١٥% من الاستثمارات المشتركة وعقود الأبحاث، و ١٤% من المشاركة المحدودة فى مجال الأبحاث والتنمية، وقد لوحظ أن مجال الصحة له النمو الكبير فى استثمار الصناعة (شكل ١٦-٣)، وكانت تذهب معظم الاستثمارات أساساً إلى تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم، وفى خلال السنتين الماضيتين، ازداد الاستثمار فى مجال تكنولوجيا الجسم المضاد أحادى الاستنساخ زيادة ملموسة (شكل ١٦-٤).



شكل ١٦ - ٣ الدعم الخاص لأبحاث التكنولوجيا الحيوية، تزداد الدعم الخاص لأبحاث التكنولوجيا الحيوية فى الفترة من عام ١٩٧٨ إلى عام ١٩٨٥ من لاشيء تقريباً إلى ألف وخمسمائة مليون دولار فى السنة، ويحجم دعم تراكمى وصل الآن إلى ٤ بلايين من الدولارات، وتتلقى الأبحاث المرتبطة بالصحة نصيب الأسد من الدعم مع نسبة أقل من الدعم تذهب إلى أبحاث التكنولوجيا الحيوية الزراعية، إلا أن الإسهام فى المجال الزراعى قد تزايد نوعاً ما منذ عام ١٩٨٣.



شكل ١٦ - ٤ الاستثمار المتراكم في مجالات تكنولوجيا حيوية معينة منذ عام ١٩٧٨، على الرغم من أن الاستثمار المبكر في تكنولوجيا د.ن.ا. المظم كان متوقفاً إلى حد كبير على صور التكنولوجيا الحيوية الأخرى، إلا أن الاستثمار في تكنولوجيا الجسم المضاد أحلأ الاستثمار قد تزايد بشكل سريع جداً منذ عام ١٩٨٤.

وتوجه استثمارات الصناعة في مجال التكنولوجيا الحيوية إلى الجامعات، كما توجه أيضاً إلى العمليات التقليدية جداً التي تسعى للربح، وفي عام ١٩٨٤، قمت الصناعة حوالي ١٢٠ مليون دولار للأبحاث الجامعية في مجال التكنولوجيا الحيوية، وعلى الرغم من أن هذه الاعتمادات لا تمثل إلا جزءاً صغيراً من التزايد الصناعي الكلي للأبحاث والتنمية في التكنولوجيا الحيوية، إلا أن الاستثمار يعد منتجاً، وقد أنتج البحث الذي تقوم به الجامعات ما يقرب من ربع جميع تطبيقات براءة الاختراع في التكنولوجيا الحيوية على مدى الخمس سنوات الماضية، وقد يعكس هذا الوضع، حقيقة أن الأبحاث الجامعية التي تدعمها الصناعة، تميل لأن تكون أكثر تطبيقاً من الأبحاث التي تمولها منح المعاهد القومية للصحة . ويبرهن التمويل من الصناعة للجامعات على فاعليته الناجحة في التشجيع على نقل نتائج الأبحاث الأساسية إلى التطبيقات التكنولوجية الحيوية في مجال

الأدوية والمواد الكيميائية والزراعة، ومع ذلك، فإن وصول المنتجات المصنعة إلى السوق، يعتمد على الجانب الآخر من جسر التكنولوجيا الحيوية الذى يتعامل مع الرقابة التنظيمية لتطوير المنتج.

السياسات التنظيمية للتكنولوجيا الحيوية فى الولايات المتحدة

US biotechnology regulatory policies

فى فبراير عام ١٩٧٥، اتخذت مجموعة دولية من العلماء، خطوة غير مسبقة للدعوة لعقد اجتماع لدراسة المفاهيم الأخلاقية والأمان فى تكنولوجيا الـ د.ن.أ. المطعم المكتشف حديثاً فى ذلك الحين، فالقدرة على تجميع الـ د.ن.أ. من أنواع مختلفة، وعلى إدخال جينات غريبة فى الكائنات المجهرية ، قد أثارت مخاوف من أن يتمكن العلماء بطريقة غير مقصودة من تخليق فيروسات جديدة والتي قد ينجم عنها أوبئة مدمرة، أو تفسد بشكل أو آخر التوازن الدقيق للطبيعة.

وإحدى نتائج هذا الاجتماع الذى عقد فى مركز مؤتمرات أسليومار فى باسيفيك جروف بكاليفورنيا، تطوير سلسلة من التوجيهات الإرشادية التى تنظم، وفى بعض الحالات تمنع تجارب الـ د.ن.أ. المطعم، وقد صدرت التوجيهات الإرشادية فى الولايات المتحدة تحت رعاية المعاهد القومية للصحة ، وتقضى التوجيهات الإرشادية، من بين أشياء أخرى، بأن تقدم كل التجارب التى تمولها المعاهد القومية للصحة، والمتضمنة على الـ د.ن.أ. المطعم إلى اللجنة الاستشارية للـ د.ن.أ. المطعم التابعة للمعاهد القومية للصحة للموافقة عليها، وطورت دول أخرى توجيهاتها الإرشادية، على الرغم من أنها كانت مشابهة للتوجيهات التى سنتها المعاهد القومية للصحة .

وفى فبراير عام ١٩٨٥، احتفلت الأكاديمية القومية للعلوم بالذكرى السنوية العاشرة لمؤتمر أسيلومار، من خلال عقد ندوة عن التكنولوجيا الحيوية، وصرح ألكسندر رتش Alexander Rich من معهد ماساشوسيتس للتكنولوجيا فى الندوة، أنه تم إجراء مئات الآلاف من تجارب الد.ن.أ. المطعم خلال العشر سنوات الماضية، وأن الكثير من المخاوف التى أثبتت بشأن المخاطر المحتملة عن هذه التكنولوجيا فى مؤتمر أسيلومار، قد تم القضاء عليها.

وفى الوقت الراهن ، انتقل محور اهتمام الرأى العام فى الولايات المتحدة من تنظيم أبحاث الد.ن.أ. المطعم إلى طبيعة ومجال دور الحكومة فى تنظيم التطور الصناعى لمنتجات التكنولوجيا الحيوية، وقد خففت قيود التوجيهات الإرشادية للمعاهد القومية للصحة فى مجال أبحاث الد.ن.أ. المطعم،والتي طورت فى الفترة ما بين عام ١٩٧٦ و١٩٧٨،لما أظهرته الخبرة من مخاطر طفيفة من أنواع التجارب الروتينية فى المعامل ، ومع ذلك،فلا تزال التوجيهات الإرشادية باقية بمثابة معايير قومية لمراقبة الأبحاث التى تدعمها جهات فيدرالية،والتي تؤدى بصورة أساسية فى معامل الجامعات، بيد أن إذعان الصناعة للتوجيهات الإرشادية كان إذعانا تطوعيا ،ولما أصبح التصنيع التجارى لمنتجات تكنولوجيا الد.ن.أ. المطعم حقيقة واقعة،فقد تزايدت الحاجة إلى وجود تنظيم متناسق للإنتاج والتصريح بتداول هذه المنتجات.

لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية

The Biotechnology Science Coordinating Committee

ظل الغموض يخيم على تنظيم منتجات التكنولوجيا الحيوية الأولى، وخصوصاً في تلك الحالات التي كانت فيها المنتجات من كائنات مجهرية متحولة وراثياً، والتي كان يزعم إطلاقها إلى البيئة بطريقة مقصودة، وكانت متطلبات التنظيم والتي تتطلب إخضاع المنتج للرقابة، ولأنواع التنظيمات المطلوبة، وهوية الوكالة الحكومية التي تكون مسؤولة عن منتج معين يشوبها جميعاً بعض الغموض.

وفي عام ١٩٨٤، أنشئت مجموعة عمل لمجلس استشاري للتكنولوجيا الحيوية تحت رئاسة كيورث لحل هذه الموضوعات، وراجعت مجموعة العمل جميع السياسات الفيدرالية المتعلقة بتنظيم التكنولوجيا الحيوية، وأصدرت تقريراً للرأي العام في الحادي والثلاثون من ديسمبر عام ١٩٨٤، واستجابة للتعليقات التي تلقاها فيما بعد مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا والوكالات الفيدرالية الأخرى، أعلن المكتب عن تأسيس لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية (BSCC) في الرابع عشر من نوفمبر عام ١٩٨٥. وتتكون اللجنة من كبار ممثلي الوكالات التي ترعى أو تنظم أبحاث التكنولوجيا الحيوية أو منتجاتها، واشتملت اللجنة على ممثلين من المعاهد القومية للصحة ومؤسسة العلوم القومية، ومصلحة الزراعة، ووكالة الحماية البيئية، وهيئة الأغذية والدواء، ويتولى رئاسة هذه اللجنة بالتناوب مساعد مدير العلوم البيولوجية والسلوكية في مؤسسة العلوم القومية ومدير المعاهد القومية للصحة.

وكانت المسؤولية الأولية الكبرى للجنة، أن تساعد السياسة الداخلية لمجموعة العمل الاستشارية للتكنولوجيا الحيوية على تنمية نظام متناسق لتنظيم التكنولوجيا الحيوية، هذا النظام الذى أعلن فى السادس عشر من يونيو عند ١٩٨٦، يضع الخطوط العريضة لمجال اختصاص الوكالات العديدة، والوكالات الثلاث ذات السلطات التنظيمية الرئيسة هي : هيئة الأغذية والدواء (FDA) وهيئة الزراعة الأمريكية (USDA) ووكالة الحماية البيئية (EPA)، وحددت اللجنة السلطات القانونية لكل وكالة، وبعد ذلك حددت أى من الوكالات التى سيكون لها الريادة فى تنظيم منتجات معينة (جدول ١٦-٢).

واقترحت لجنة تسويق علوم التكنولوجيا الحيوية أيضاً وضع تعريفات للكائنات العضوية التى تتطلب تنظيم لتقديم أساس علمى عام للرقابة التنظيمية بواسطة الوكالات الفيدرالية الفردية، وتبعاً لتوصيات اللجنة، فإن هناك فئتين من الكائنات العضوية ستخضعان للتنظيم، وتشمل الفئة الأولى الكائنات العضوية المهندسة وراثياً التى تكونت من الاتحاد المتعمد للمادة الوراثية من أنواع مختلفة، وتشمل الفئة الثانية الكائنات المجهرية التى تعتبر ذاتها كائنات ممرضة، أو تم تغييرها وراثياً بواسطة جينات من كائنات ممرضة، ويعرف الكائن الممرض (pathogen)، بأنه فيروس أو كائن مجهرى ، له القدرة على إحداث المرض للكائنات الحية الأخرى، سواء أكانت إنسان أم حيوان أم نبات أم كائن مجهرى آخر.

ويمكن أن يعفى كائن عضوى من أى فئة من المراقبة، إذا كانت المادة الوراثية التى يحتويها لا تعتبر أنها تشكل خطراً متزايداً على صحة الإنسان أو البيئة، وستشمل الأمثلة على الكائنات العضوية المهندسة وراثياً، التى تطورت

بنقل تسلسل د.ن.أ يتصف بخصائص مميزة ،الذى لا يشفر عن منتج جينى، حتى لو كان ذلك الـ د.ن.أ قد جاء فى الأصل من كائن ممرض (فيروس مثلاً)، وتضم هذه التسلسلات تلك التسلسلات المستخدمة فى تنظيم تعبير الجين.

جدول ١٦-٢ وكالات الحكومة الفيدرالية الأمريكية، التى لها مسئولية الموافقة على منتجات التكنولوجيا الحيوية التجارية العديدة، وفقاً لإطار العمل المتناسق للجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية.

Subject	Responsible agency(ies)
Foods/food additives	FDA ^a , FSIS ^b
Human drugs, medical devices and biological products	FDA
Animal drugs	FDA
Animal biological products	APHIS
Other contained uses	EPA
Plants and animals	APHIS, ^a , FSIS, ^b FDA ^c
Pesticide microorganisms released in the environment (all)	EPA, ^a APHIS, ^d
Other uses (microorganisms):	
١. Intergeneric combination	EPA, U APHIS, ^d
٢. Intrageneric combination:	
(a) Pathogenic source organism:	
agricultural use	APHIS
non-agricultural use	EPA APHIS, ^d
(b) No pathogenic source organisms	EPA Report
Non-engineered pathogens	
(i) Agricultural use	APHIS
(ii) Non-agricultural use	EPA, ^a APHIS ^d
Non-engineered non-pathogens	EPA Report

(أ) وكالة رئيسية

(ب) تضى الـ FSIS (خدمة فحص وأمان الغذاء) تعمل من خلال السكرتارية المساعدة للزراعة لخدمة الفحص والتسويق، ومسؤولة عن الاستخدام الغذائى.

(ج) تكون الـ FDA مضية عندما يتعلق الأمر باستخدام الغذاء.

(د) الـ APHIS (هى جهة خدمة فحص الصحة الحيوانية والنباتية)، وتكون مسؤولة عندما يكون الكائن العضوى البقوى قلة نياقية أو ممرض للحيوان أو مادة تنظيمية تتطلب تصريح.

(هـ) لا تطبق الشروط الـ EPA إلا فى الإطلاع البينى فى ظل استخدام قانون جديد مهم، تنوى الـ EPA استخدامه.

وحيث أن اللجنة قد صنفّت الكائنات العضوية بغرض المراجعة التنظيمية، فسوف تكون مهمتها التالية تحديد ما يشكل "إطلاق في البيئة"، ويعتبر هذا التعريف (التحديد) مهماً، لأنه يمهد الطريق لوكالة الحماية البيئية وهيئة الزراعة الأمريكية لتنظيم منتجات التكنولوجيا الحيوية، التي يزعم استخدامها في التطبيقات الزراعية والكيميائية خارج المعمل أو وحدة التصنيع، ونتيجة لذلك، تنشئ اللجنة مجموعة عمل لتطوير توصيات علمية بشأن الصوبة الزجاجية الملوثة، ولكيفية إجراء تجارب التجارب الحقلية محدودة النطاق، التي يجب إجرائها قبل التفكير في إجراء إطلاقات بيئية واسعة الانتشار.

ولجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية من خلال نظامها الشامل، أخذت في الاعتبار الأهداف العريضة التي كانت قد اقترحتها مجموعة خاصة من خبراء الحكومة، التي دعت إليها منظمة التعاون الاقتصادي والتنمية (OECD)، وفي عام ١٩٨٦، أصدرت المجموعة الخاصة تقريراً بعنوان اعتبارات أمان الـ د.ن.أ. المطعم؛ اعتبارات الأمان الصناعية والبيئية والزراعية لأوجه استعمال الكائنات العضوية التي يتم الحصول عليها بأساليب الـ د.ن.أ. المطعم، وطالب التقرير بطرق دولية متناسقة لتنظيم المنتج.

ومن أجل ضمان تبادل البيانات والتقليل من العوائق التجارية، أوصى تقرير منظمة التعاون الاقتصادي والتنمية بمزيد من الدعم للأبحاث والتنمية من أجل اختبار الطرق، وتصميم المعدات، ودراسات التصنيف الميكروبي، لإصدار معلومات تستخدمها منظمات دولية ووطنية مثل، منظمة الصحة العالمية (WHO)

ومفوضية المجموعات الأوروبية، وأوصى التقرير أيضاً بأن التطبيقات الصناعية واسعة النطاق من التكنولوجيا الحيوية، يجب أن تستغل طالما كان ممكناً، الكائنات المجهرية التي تعتبر في حد ذاتها قليلة الخطورة، وأن تتداول هذه الكائنات في ظل ظروف "من الممارسة الصناعية المناسبة واسعة النطاق". وطالب بحث آخر بتحسين أساليب المراقبة والتحكم في الإطلاق غير المتعمد للكائنات العضوية المهندسة وراثياً التي تستخدم على نطاق واسع في التطبيقات الصناعية.

هيئة الأغذية والدواء

The Food and Drug Administration

لهيئة الأغذية والدواء (FDA) سلطة تنظيم تصنيع الغذاء والإضافات الغذائية والعقاقير ومستحضرات التجميل، ومن الناحية الفعلية، تخضع جميع شركات التكنولوجيا الحيوية لإشراف هيئة الأغذية والدواء، لأن العديد من منتجات التكنولوجيا الحيوية موجودة في مجال الصحة، وحتى الآن، استطاعت هيئة الأغذية والدواء أن تنظم منتجات التكنولوجيا الحيوية دون إجراء تغييرات كبيرة في وضعها الحالي، وتتص سياسة هيئة الأغذية والدواء على أن "استخدام أسلوب تكنولوجيا حيوى معين، لا يتطلب عملية إدارية مختلفة، ويجب أن يتأسس تنظيم هيئة الأغذية والدواء على التقييم العلمى الفعلى للمنتجات، وليس على فروض مسبقة عن أية عمليات معينة".

وتستخدم هيئة الأغذية والدواء وثائق بعنوان "مسائل تؤخذ فى الاعتبار" لتقديم دليل إرشادى عن كيفية تطبيق نظم هيئة الأغذية والدواء على منتجات

التكنولوجيا الحيوية، وهذا الإجراء مرّن بدرجة كافية للتكيف مع التغيرات العلمية السريعة وتطورات المنتج، وقد صدرت خمس من هذه الوثائق ، وتتعامز هذه الوثائق مع تصنيع الأجسام المضادة أحادية الاستساخ للتشخيص المعملى. ومع إنتاج واختبار عقار الإنترفيرون للاستخدام التجريبي على البشر، وتصنيع الأجسام المضادة أحادية الاستساخ للأغراض العلاج والتشخيص فى البشر. وإنتاج واختبار العقاقير الجديدة والمواد البيولوجية التى تنتجها تكنولوجيا الـ د.ن.أ.المطعم، وتشخيص سلاسل الخلايا المستخدمة لصنع المنتجات البيولوجية.

وتطالب هذه الوثائق بمعلومات محددة عن أصول وصفات كل سلاسل الخلايا التى استخدمت فى صنع المنتجات المعنية ، فهى تطلب على سبيل المثال،فيما إذا كانت الخلايا لها إمكانية إحداث سرطان، وتوضح الوثائق أيضاً بتعبيرات جلية متطلبات شروط الجودة لتقييم نقاء وهوية المنتج، واقترحت عدد من الاختبارات لتوضيح أن المنتج خالياً من الملوثات،سواء أكانت من عوامل معدية أم من د.ن.أ. أم من بروتينين.

المعاهد القومية للصحة

The National Institutes of Health

تتعاون المعاهد القومية للصحة NIH مع هيئة الأغذية والدواء فى إصدار التوجيهات المختصة بمستقبل استخدام الجينات المستسَخة فى العلاج بالجين للبشر، ويجب أن يوافق على البروتوكولات الإكلينيكية لتجارب العلاج بالجين التى تمولها المعاهد القومية للصحة اللجنة الاستشارية للـ د.ن.أ.المطعم التابعة للمعاهد القومية للصحة، والتى تعرف بطريقة أخرى باسم الـ RAC،

وللإعداد لهذا، أصدرت المعاهد القومية للصحة وثيقة "مسائل تؤخذ في الاعتبار" عن تصميم وتقديم بروتوكولات لإدخال جينات جديدة فى الخلايا الجسدية البشرية، وتشير التقديرات بأن هذه التجارب الإكلينيكية قد تبدأ بحلول عام ١٩٨٨ (انظر أيضاً الفصل الخامس عشر).

ومما لاشك فيه أن تدقيق الجمهور الكونجرس على المفاهيم الأخلاقية للعلاج بالجين سيستمر، وخصوصاً عند أية محاولة لنقل الجينات إلى سلسلة جراثومية، والتي قد تحدث تغييراً وراثياً دائماً لشخص يجرى له هذا العلاج، إلا أن لم يتم التفكير فى نقل سلسلة جراثومية إلى البشر فى الوقت الحالى.

فى عام ١٩٨٦، طلبت اللجنة التى تتخذ من بوسطن مركز لها والمسؤولة عن الوراثة، من الـ RAC أن تعدل توجيهات المعاهد القومية للصحة المتعلقة بأبحاث الـ د.ن.أ. المطعم، لقصر العلاج بجين الخلية الجسدية على "الحالات المهددة للحياة أو التى تؤدى إلى عجز شديد"، وأن تمنع العلاج بالسلسلة الجراثومية، والـ RAC ، التى تعمل بمقتضى لجناتها الفرعية المختصة بالعلاج بالجين بأنه لم تكن مطلوبة تعديلات جديدة للتوجيهات، لم تقم بالتغييرات المقترحة، ولم ترغب لجنة المعاهد القومية للصحة فى أن تتبنى قيود التى من شأنها أن تقلل من مرونتها فى تقديم المشورة المختصة بتجارب العلاج بالجين.

ويحتمل أن تصبح المعاهد القومية للصحة معنية بمجال آخر يتعلق بحقوق المرضى، فالمرضى أقاموا دعوى لإثبات حق ملكيتهم للجينات والخلايا التى تؤخذ منهم أثناء التجارب الإكلينيكية، والتى أظهرت أن لها قيمة تجارية محتملة، ويحتمل أن يدعو هذا الموقف إلى أن تطلب المعاهد القومية للصحة من مجالس

المراجعة الرسمية المحلية ،و المسؤولية عن تحديد ما إذا كان الغرض من التجارب الإكلينيكية التى يقوم بها الباحثون فى المعهد تجارب أخلاقية،أن تتأكد من أن المرضى على دراية كاملة باحتمالات الاستخدام التجارى لأعضاء أجسامهم،قبل أن يشتركوا فى الأبحاث الإكلينيكية، ويراجع مكتب تقييم التكنولوجيا هذا الموضوع أيضاً.

وكالة الحماية البيئية

The Environmental Protection Agency

وكالة الحماية البيئية (EPA) لها سلطة تنظيم الأنشطة،والتي تتضمن على التصنيع الكيميائى، واستخدام مبيد الآفات،التي قد تسبب تلوثاً للأرض أو الهواء أو الماء، وبدأت الوكالة فى الفترة الأخيرة تنظيم التكنولوجيا الحيوية الصناعية فى ظل القانون الفيدرالى للمبيد الحشرى والمبيد الفطرى ومبيد القوارض (FIFRA)،وقانون التحكم فى المواد السامة (TSCA).

وينشأ الاهتمام التنظيمى لوكالة الحماية البيئية من النتائج الخطيرة المحتملة من المنتجات الكيميائية والزراعية،التي تم إنتاجها عن طريق التكنولوجيا الحيوية،ويجرى إطلاقها خارج المعمل، ويمتد الاهتمام إلى الاختبار الحقلى للكائنات العضوية المهندسة وراثياً، وأول هذه الحالات-والتي توضح بعض من الفوضى التنظيمية المبكرة- قد ظهرت عام ١٩٨٣،عندما وافقت الـ RAC التابعة للمعاهد القومية للصحة على إجراء اختبار حقلى لتجربة على سلالة كائن عضوى معدل وراثياً، لمقاومة ضرر الصقيع فى النباتات.

وكان من المزمع أن يقوم بالتجربة ستيفن ليندو Steven Lindow ونيكولاس بانبولوس Nickolas Panopoulos من جامعة كاليفورنيا فى بركلى، وقد قام هذان الباحثان بتعديل البكتيريا وراثياً التى توجد فى البيئة بصورة طبيعية، من خلال نزع الجين الذى يجعل الخلايا البكتيرية تعمل كمراكز تنوية nucleating centres، لتكوين بلورات الثلج، وكانت الفكرة، أنه عندما ينزع الجين فإن البكتيريا ستكون أقل قدرة على بدء تكوين الصقيع فى النباتات. وبعد أن وافقت لجنة المعاهد القومية للصحة على إجراء التجربة، قام جيرمى ريفكن Jeremy Rifkin من مؤسسة الاتجاهات الاقتصادية واشنطن دى سى، برفع دعوى لإيقاف الاختبار المقترح، على أساس أن المعاهد القومية للصحة فشلت فى تقييم التأثير البيئى لإطلاق الميكروب المعدل، تبعاً لما يتطلبه قانون السياسات البيئية القومية، وكسب ريفكن الدعوى، وشرعت المعاهد القومية للصحة فى القيام بالتقييم اللازم للبيئة.

إلا أن الموقف قد ازداد تعقيداً، لأن العلوم الوراثية المتقدمة، وهى شركة تعمل فى مجال التكنولوجيا الحيوية فى كاليفورنيا، أرادت بالضرورة القيام بنفس التجربة، وعلى الرغم من أن توجيهات الـ د.ن.أ. المطعم لا تتطلب موافقة الـ RAC على التجارب التى لا تدعمها الحكومة مالياً، إلا إن شركة علوم الوراثة المتقدمة قدمت طواعية تجربتها المقترحة للجنة.

وفى تلك الأثناء بدأت وكالة الحماية البيئية فى تطوير خططها الخاصة لتنظيم الميكروبات المعدلة وراثياً، التى يقصد منها الإطلاق إلى البيئة، وسيكون لهذا العمل ميزة ضم الكائنات الحية الدقيقة التى تطورها المؤسسات التجارية، التى لا تشملها توجيهات المعاهد القومية للصحة ، وبعد ذلك، قدمت شركة علوم الوراثة

المتقدمة تجربتها المقترحة لوكالة الحماية البيئية كما فعلت الشركات الأخرى، التي كانت تخطط لتجارب تتضمن على الإطلاق البيئي للنباتات أو البكتيريا المعدلة وراثياً.

وفي نوفمبر ١٩٨٥، عدلت في نهاية الأمر المعاهد القومية للصحة توجيهاًها لأبحاث الـ د.ن.أ. المطعم ووافقت على الامتثال لرغبة وكالة فيدرالية أخرى قدمت إليها التجربة، إذا كانت مراجعات كلتا الوكالتين ستتدخلان، وبالنسبة لحالة الميكروب المقاوم للصقيع، قررت المعاهد القومية للصحة أن مراجعة وكالة الحماية البيئية للتأثير البيئي المحتمل للبكتيريا المعدلة وراثياً ستكون كافية، ونتيجة لذلك، قدم الباحثان ليندو وبانوبولوس طلبهما إلى وكالة الحماية البيئية.

وعلى الرغم من أن وكالة الحماية البيئية قد وافقت على طلب شركة علوم الوراثة المتقدمة، للسماح لها بإجراء اختبار حقلي للبكتيريا في نوفمبر ١٩٨٥، إلا أن الشركة اعترفت في يناير ١٩٨٦ بأنها قامت بإجراء اختبار على الميكروب في الخلاء - فوق سطح مبنى الشركة - قبل عام من حصولها على تصريح من وكالة الحماية البيئية للإطلاق البيئي، وكانت نتيجة ذلك، أن أعلنت وكالة الحماية البيئية أن الشركة خالفت قوانين الوكالة، وعلقت الموافقة، وفرضت غرامة على الشركة.

وفي اتفاق أعلن في يونيو عام ١٩٨٦، سحبت وكالة الحماية البيئية اتهاماتها بأن الشركة زيفت البيانات في طلبها التي قدمته للوكالة، وتخطط الشركة لتقديم طلب للحصول على موافقة، وفي تلك الأثناء، وافقت وكالة الحماية البيئية في شهر مايو على طلب ليندو وبانوبولوس للسماح لهما بإجراء تجاربهم، ومع

ذلك، فقد أدى احتجاج المجتمع الذى تجرى فى منطقتيه التجارب والتحديات القانونية الأخرى، إلى منع القيام بإجراء التجارب خلال فصل نمو عام ١٩٨٦.

وهذه القصة التنظيمية المطولة، التى كانت لها نتيجة ساهرة فى أن البكتير المقاوم للصقيع، الذى أنتج عن طريق إلغاء جين، ستعرض حالياً لتنظيم صارم بدرجة أقل، وفقاً للنظام المنسق الجديد الذى تتبعه لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا، وفى اجتماع الـ RAC التابعة للمعاهد القومية للصحة الذى عقدته فى سبتمبر عام ١٩٨٦، وافقت على دراسة اقتراح يجعل توجيهات المعاهد القومية للصحة لا يشمل إلا الكائنات المجهرية التى تم تعديلها وراثياً بإضافة دن.أ غريب، ونتيجة لذلك، تعفى تجارب إلغاء الجين من المراجعة.

وتعفى التوجيهات الحالية تجارب كهذه تجرى فى المعمل، ولكن ليست تحت ظروف من الإنتاج الضخم، أو عندما يكون الإطلاق البيئى متضمناً، وعلى العموم، يجب أن يقدم النظام دليل أفضل فيما يتعلق بالمتطلبات التنظيمية لكل من الوكالات الحكومية العديدة ولصناعة التكنولوجيا الحيوية، ونتيجة لذلك، يعمل على تقوية خضوع الصناعة لهذه المتطلبات.

وتقوم وكالة الحماية البيئية حالياً بتحديد أبعادها التنظيمية بالإعلان عن أن أقسام الزراعة والمراقبة الداخلية على النباتات والحيوانات، وأن اختصاص سلطة هيئة الأغذية والدواء تشمل الغذاء والإضافات الغذائية والعقاقير ومستحضرات التجميل، ويمتد مجال وسلطة وكالة الحماية البيئية من خلال قانون FIFRA و TSCA، إلى تنظيم تصنيع مبيدات الآفات والمواد الكيميائية، على الرغم من أن

نطاقاً عريضاً من صناعة التكنولوجيا الحيوية يخضع لمراجعة المنتج من قبل وكالة الحماية البيئية.

وتبنت وكالة الحماية البيئية لتنظيماتها، المبادئ العلمية والمعايير التي أعلنتها لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا من أجل تصنيف الكائنات المجهرية المعدلة وراثياً، والمنتجات الميكروبية التي تصنع من كائنات مجهرية معدلة وراثياً، التي تعتبر هي نفسها كائنات ممرضة، أو تحتوى على مادة وراثية من كائن ممرض، يجب أن تخضع للمراجعة التنظيمية، قبل أن يصرح بإطلاقها إلى البيئة إلا إذا كان الغرض من المنتج للاستخدام الزراعى غير المبيد للآفات فقط ، ففي هذه الحالة، يجب أن يراجع بدلاً من ذلك بواسطة مصلحة الزراعة.

وستراجع وكالة الحماية البيئية أيضاً تنظيم تلك الكائنات المجهرية التي تكونت بواسطة الهندسة الوراثية بمواد لم تأت من مصدر كائنات ممرضة، فالمنتجات الميكروبية، سواء أكانت منتجات مسببة للمرض أم غير مسببة للمرض، ستخضع لمراجعة الـ FIFRA (بالنسبة لمبيدات الآفات)، وتخضع الـ TSCA (بالنسبة للمواد الكيميائية الأخرى)، قبل أن يصرح بإطلاقها للبيئة ، بما فى ذلك الاختبارات الحقلية محدودة النطاق ، والأبحاث الأخرى المتعلقة بالتأثير البيئى من منتج معين.

وعلى الرغم من أن التنظيمات السابقة لوكالة الحماية البيئية للإطلاق البيئى تعفى الاختبارات الحقلية على مساحات أصغر من عشر أفدنة، فإن هذا الإعفاء لا ينطبق على الكائنات المجهرية المعدلة وراثياً، بالإضافة إلى ذلك، الكائنات المجهرية غير المتوطنة فى المنطقة، التي تستخدم كمبيدات آفات، سوف تخضع

للمراجعة التنظيمية بموجب قانون FIFRA، غير أن المراجعة ستكون مختصرة بالنسبة للكائنات المجهرية غير المعدلة وراثياً.

كانت رقابة الكونجرس والأنشطة التشريعية على الإطلاق البيئي لمنتجات التكنولوجيا الحيوية واضحة في عامي ١٩٨٥ و١٩٨٦، وسوف تستمر هذه الرقابة من غير شك، وقد قدمت مشروعات قوانين إلى الكونجرس، بشأن تأسيس سلطات منفصلة داخل وكالة الحماية البيئية من أجل تنظيم أبحاث التكنولوجيا الحيوية والاختبار الحقلى وتسويق المنتج.

ويعتمد التنظيم السليم فى المجال البيئى على وجود طرق دقيقة لتقييم مخاطر إطلاق منتج، ولا يزال هناك الكثير من الأبحاث الواجب القيام بها على أوجه عديدة من تقييم المخاطر، ولا يزال هناك الكثير الواجب معرفته، على سبيل المثال، ما السرعة التى تنتقل بها مادة وراثية أدخلت فى كائن عضوى إلى كائنات أخرى فى البيئة المحيطة بها، والتواريخ الطبيعية للبكتيريا وتصنيفها، التى تعيش فى بيئات مائية أو فى التربة تتطلب أيضاً مزيداً من الفحص.

هيئة الزراعة الأمريكية

US Department of Agriculture

تنظم هيئة الزراعة الأمريكية (USDA) منتجات زراعية، تشمل النباتات واللحوم ومنتجات الدواجن، وفى مارس عام ١٩٨٦، أصدر مكتب المحاسبة الحكومى الأمريكى (GAO) تقريراً أبرز فيه قصور هيئة الزراعة الأمريكية فى مجال التكنولوجيا الحيوية، وذكر تقرير مكتب المحاسبة الحكومى أن

المصلحة لم يكن لديها هيكل تنظيمي واضح ، وإن لجنة أبحاث الـ د.ن.أ. المطعم التابعة لها تفتقر إلى السلطة والتوجيه لمراقبة أبحاث التكنولوجيا الحيوية وتنظيمها، وطالب التقرير بأن الهيكل التنظيمي لهيئة الزراعة الأمريكية يجب أن يكون محدداً بوضوح، واقترحت لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا نظاماً متناسقاً يساعد على مواجهة هذه المشاكل.

وتطبق توجيهات هيئة الزراعة الأمريكية الخاصة بتنظيم التكنولوجيا الحيوية الزراعية على كل مجالات الأبحاث التي تمولها المصلحة، وتتضمن توجيهات المصلحة المتعلقة بأبحاث الـ د.ن.أ. المطعم، التي تتأسس جزئياً على توجيهات المعاهد القومية للصحة كل أوجه الأبحاث، فهي تشمل الأبحاث التي تؤدي داخل ظروف معملية، وعلى أبحاث عزل خاصة، بحسب الأحوال، وعلى سبيل المثال، في تطوير لقاحات لأمراض خطيرة مثل مرض الفم والقدم، ويأتي الإطلاق البيئي للكائنات المجهرية المعدلة وراثياً أيضاً تحت نطاق السلطة التنظيمية لهيئة الزراعة الأمريكية .

وتتعرف هيئة الزراعة الأمريكية على الكائنات الحية ، التي تنوى تنظيمها وفقاً للتعريفات التي تحصل عليها من لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا، وتعتبر اللقاحات من بين المنتجات التي ترغب المصلحة في تنظيمها للاستخدام البيطري، وبالنسبة للمنتجات البيولوجية البيطرية، تقدم هيئة الزراعة الأمريكية دليلاً إرشادياً تنظيمياً عن كيفية إجراء التجارب الحقلية التي تتضمن على كائنات مجهرية مهندسة وراثياً وحية، وعن أي بيانات مطلوبة لدعم التطبيقات من إجراء استخراج تصاريح للمنتج.

وتستعمل هيئة الزراعة الأمريكية أيضاً عن تنظيم المنتجات المصنوعة بواسطة الهندسة الوراثية من الآفات النباتية، والتي تعرف بأنها كل الكائنات الحية التي يمكن أن تسبب أمراضاً أو تحدث تلفاً للنباتات، وتعلن الوكالة أن سلطاتها التنظيمية والتشريعية التقليدية فيما يخص البذور واللحوم ومنتجات الدواجن، تطبق على السواء على كل منتجات التكنولوجيا الحيوية في هذه الفئات، وأنه ليس هناك تغيير مطلوب في الوقت الحالي.

كان أحد تطبيقات التكنولوجيا الحيوية المحتملة يستدعي قدراً كبيراً من الاهتمام، وهو تطوير سلالات جديدة من الحيوانات الأليفة، عن طريق إدخال جينات جديدة إلى السلاسل الجرثومية للحيوانات، وكما ذكرنا في الفصل الخامس عشر، فإن الباحثون يسعون إلى تربية عدد أكبر من خنازير وأغنام سريعة النمو، عن طريق نقل جينات هرمون النمو إلى الحيوانات.

وفي عام ١٩٨٥، رفع رفيكن دعوى من أجل وقف تجارب نقل الجين هذه، على أساس أن هيئة الزراعة الأمريكية لم تنشر فقرة التأثير البيئي المطلوبة لهذا البحث، وقد طالب المحكمة بعد ذلك بتأسيس قاعدة بأنه لا يجب أن تكون هناك عراقيل أمام تهجين الحيوانات الثديية، ورفضت محكمة مقاطعة واشنطن وكولومبيا الدعوى في إبريل عام ١٩٨٦، وذكرت أن فقرة التأثير البيئي لم تكن مطلوبة، لأن البحث لم يتقدم بصورة كافية حتى يجرى هذا التقييم.

هيئة الصحة والأمان المهني

The Occupational Safety and Health Administration

إن المهمة التي تضطلع بها هيئة الصحة والأمان المهني (OSHA)، هي توفير مكان عمل آمن للعمال، ووفقا لبيان أخير للوكالة، فإن تنظيماتها الحالية تقدم بالفعل أسس "ملائمة وقابلة للتنفيذ" لحماية العمال بصورة آمنة في صناعة التكنولوجيا الحيوية، وينص بيان الوكالة على أن "لم تظهر حاجة إلى تنظيمات إضافية لأماكن العمل تستخدم التكنولوجيا الحيوية في الوقت الحالي، حيث أنه لم يتم التعرف على خطر أو مخاطر من التكنولوجيا الحيوية على وجه الخصوص".

هيئة الدفاع والتجارة

The Commerce and Defense Department

تعتبر ضوابط التصدير، مجال آخر للرقابة التنظيمية، يقع ضمن اختصاصات هيئة التجارة، وهناك خطوات جارية في هيئة التجارة لوضع مسودة تنظيمات تحكم التكنولوجيا الحيوية، والقضية هي كيفية موازنة المصالح المتضاربة، فتنظيمات التصدير تحفزها إلى حد كبير ظروف الأمن القومي.

وهيئة الدفاع التي تقدم المشورة لهيئة التجارة في مسائل الأمن القومي، ترغب في تقييد تصدير التكنولوجيا الحيوية، التي قد تساعد الخصوم المحتملين على شن حرب كيميائية أو بيولوجية، وتصنف تكنولوجيا التخمير وأجهزة الفصل كبيرة السعة في أول قوائم التصدير التي ستأثر بهذا التقييد، ومع ذلك، وعلى الرغم من أن ضوابط التصدير قد تكون ضرورية لحماية الأمن

القومى، فإذا كانت هذه الضوابط متشددة أو صارمة، فقد تضرر بالمبادلات الدولية التى تعتمد عليها أبحاث التكنولوجيا الحيوية الصناعية والأكاديمية.

ولجنة الرئيس المختصة بالتنافس الصناعى، والتى ذكرناها من قبل، ذكرت أن الأمن القومى وبالإضافة سياسة خارجية ناجحة، يعتمدان على الحفاظ على التنافس الصناعى للولايات المتحدة قائماً، وأن قيود التصدير بصفة عامة تنافى الأخلاق التنافسية، وقد قامت اللجنة بسن بعض التوصيات الرائعة فى موضوع الدور الفيدرالى فى تطوير سياسات التجارة الدولية، بما فيها تنظيمات التصدير.

ومن بين هذه التوصيات، إنشاء هيئة للتجارة على مستوى وزارى لتحسين صنع سياسة فى هذا المجال، وآلية فعالة أكثر اتساقاً لموازنة السياسات المحلية والسياسات الدولية، وطالبت اللجنة أيضاً بمراجعة قوانين التجارة المحلية، ووضع نظام لسياسة عدم الثقة الأمريكية، لى تتضمن على إعفاءات للمؤسسات المندمجة التى تشجع الأهداف القومية، وتقتصر توصيات أخرى، تبسيط وتنظيم عملية استخراج التصاريح الحالية لكل عمليات التصدير المنضبطة، وتعتبر هذه التغييرات مطلوبة للحفاظ على استجابات تنافسية مع الدول الأخرى، وأخيراً، اقترحت لجنة الرئيس عدة إجراءات لتمويل الصادرات، وانتهت بالمطالبة بنظام تجارى قوى متعدد الجوانب.

وفى داخل الولايات المتحدة، عبرت بعض المجموعات عن مخاوفها من أن تستغل التكنولوجيا الحيوية فى أغراض الحرب البيولوجية، فريفكن، على سبيل المثال، قدم اقتراحاً إلى RAC، حيث طالب بمجموعة عمل لفحص هذه الاستخدامات المحتملة، إلا أن الاقتراح لم يجد أذناً صاغية، والشىء الموازى

لهذا فى الأهمية، هو بيان من مصلحة الدفاع، يذكر أن مجموعة العمل المقترحة غير ضرورية، حيث تتجارب المصلحة بشكل كامل مع سياسة قومية، كما أوضحتها معاهدة الأسلحة البيولوجية فى عام ١٩٧٢، التى تمنع الأبحاث لأغراض الأسلحة البيولوجية، وتؤكد هيئة الدفاع أيضاً على أن كل برامجها البحثية المتضمنة الـ د.ن.أ. المطعم، غير مصنفة، وتجرى وفقاً لتوجيهات المعاهد القومية للصحة.

وفى مراجعة لفاعليات معاهدة الأسلحة البيولوجية، التى عقدت فى جنيف فى سبتمبر عام ١٩٨٦، كان الموضوع الأساسى هو سوء الاستخدام المحتمل للتكنولوجيا الحيوية فى الحرب البيولوجية، وقد تم التوصل إلى اتفاقية فى عدد من الخطوات لتبادل المعلومات والبيانات فى مجال الأبحاث والتنمية التكنولوجية الحيوية، لضمان عدم استخدامها فى تطوير أسلحة بيولوجية.

ورفع ريفكن دعوى أيضاً ضد مصلحة الدفاع لى تؤجل خططها لإنشاء معامل جديدة فى Dgway Proving Grounds فى يوتاه ، لاختبار الأيروسولات البيولوجية المهلكة والشديدة العدوى، وتذرت الدعوى بأن المصلحة فشلت فى الإعداد لبيان عن التأثير البيئى لبرنامج أبحاثها البيولوجية، وأمرت المحكمة بمنع إنشاء المعمل، إلى أن يقوم الجيش بإجراء التقييم المطلوب عن المشاكل البيئية المحتملة، ووافق الجيش على إجرائى، وكما توضح هذه الحالة والاقتراح المقدم إلى الـ RAC، إن الجدل الشعبى قد يستمر بشأن الاستخدام الخاطئ المحتمل من التكنولوجيا الحيوية فى الحرب البيولوجية.

الخاتمة

Conclusions

لا يزال الاهتمام القومى بشأن مستقبل التنافس فى صناعات التكنولوجيا الحيوية المحلية اهتماماً متزايداً فى الولايات المتحدة واليابان والدول الأوربية، وفى كل مكان آخر، ولما كانت هذه الدول تتاضل من أجل البقاء فى حلبة التنافس، من خلال المساعدة على النمو الكبير لهذه الصناعات، فمن الجدير بالذكر معرفة كيف وصلت الولايات المتحدة إلى مركزها الريادى فى مجال التكنولوجيا الحيوية.

حدد فرانك بريس، الرئيس الحالى للأكاديمية القومية للعلوم خمسة عناصر رئيسية ساهمت فى تحقيق هذا الوضع، وهذه العناصر هى: ربع قرن من الدعم الفيدرالى للأبحاث فى البيولوجيا الأساسية، ونظام بحث قوى فى الجامعات المدفوع بمزج حفزى للأبحاث والتعليم، ووجود الإكلينيكيون فى المعامل البحثية، الذين يعرفون أن الفهم الأفضل لتنظيم الجين ، سيكون له تأثير قوى على تشخيص ومعالجة الأمراض، وقبول المجتمع العلمى لمسؤولياته فى مصارحة الشعب بالمخاطر المحتملة لتكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم والحاجة إلى مراقبة مناسبة للبحث من المعاهد القومية للصحة ومجموعاتها الاستشارية، والقدرة على إجراء أبحاث التكنولوجيا الحيوية دون الحاجة إلى مصادر تمويل ضخمة. وتوجد بالولايات المتحدة حالياً مشاركة متنامية- بين الحكومة والبحث العلمى والصناعة- ويمهد هذه المشاركة لتدفق اكتشافات العلوم الأساسية وتطبيقاتها فى مجال التكنولوجيا الحيوية، وبالرغم من ذلك، فلإطلاعهم على الأمور بأن التكنولوجيا الحيوية، قد ينجم عنها أخطار للإنسان وللبيئة، أشار دافيد بازيلون،

كبير دائرة قضاة المتقاعد فى محكمة استئناف مقاطعة كولومبيا بأمريكا، إلى أن المجتمع يجب أن يكون على دراية " بما هو معروف، وما الذى يخيف وما الذى تعلق عليه الآمال وما الذى يجب تعلمه"، يجب أن يقدم العلم تقييم لأية مخاطر قد تفرضها التكنولوجيا الحيوية، ولكنه هو المجتمع الذى يجب أن يقرر فى النهاية ما إذا كان هذا الخطر يمكن قبوله.

وتتوقف الريادة فى المستقبل فى مجال التكنولوجيا الحيوية فى الولايات المتحدة والدول الأخرى على الدعم المالى الحكومى والسياسات الضريبية للتشجيع على الابتكار التكنولوجى، بالإضافة إلى الاستثمار الحكومى فى برامج أبحاث وتنمية التكنولوجيا الحيوية، والحكومة والجامعة والصناعة التى تتعاون فى ظل مراقبة مستتيرة من الجمهور، سوف تطور قاعدة بيانات قوية لتقييم المخاطر، ومع نمو قاعدة البيانات، سوف تجعل المراجعة التنظيمية الفعالة والسريعة لمنتجات التكنولوجيا الحيوية أن يتحقق وعد التكنولوجيا الحيوية الصناعية على المستوى الدولى، لمصلحة كل من العالم الصناعى والدول الفقيرة.

انتمى بحمد الله وفضله.

مسرد بالمصطلحات الواردة بالكتاب مع شرح واف لها ،مرتبة حسب الأبجدية الإنجليزية

(A)

* نقص إنزيم أدينوزين ديأميناز : Adenosine deaminase deficiency
مرض وراثي، يتسبب عن نقص إنزيم أدينوزين ديأميناز ويؤدي إلى فقد
شديد في الاستجابة المناعية التي عادة ما تكون مميّنة في السنوات القلائل
الأولى من العمر، ويحتمل أن يكون هذا المرض من الأمراض المرشحة
للمحاولات الأولى العلاج بالجين.

* بكتيريا الأورام الزراعية: Agrobacterium tumefaciens
نوع من البكتيريا تسبب أورام العفن التاجي في النباتات التي يصيبها، وتنشأ
الأورام نتيجة اكتساب د.ن.أ منقول من بلازميد Ti من البكتيريا إلى الخلايا
النباتية أثناء الإصابة، وقد تم تحويل بكتيريا الأورام الزراعية لإدخال جينات
جديدة إلى المحاصيل النباتية.

* حمض أميني: Amino acid
جزيئات الوحدات البنائية، التي ترتبط ببعضها البعض لتكوين ببتيدات
وبروتينات.

* بزل السلي-سحب الصاء: Amniocentesis
هو إجراء يتم من خلاله سحب سائل يحتوي على خلايا جنينية من رحم امرأة
حامل، بواسطة إبرة تدخل في جدار البطن، ويمكن تحليل الخلايا للبحث عن
وجود علامات لبعض الأمراض الوراثية في الجنين.

* مضاد حيوي: Antibiotic

أي مجموعة من مواد كيميائية متنوعة من حيث التركيب، تنتجها كائنات مجهرية تشمل على البكتيريا والفطريات، التي تقتل الكائنات المجهرية الأخرى، وتستخدم المضادات الحيوية في علاج الأمراض البكتيرية، وثبتت فاعلية بعض المضادات الحيوية في العلاج الكيماوي للسرطان.

* جسم مضاد: Antibody

الأجسام المضادة، هي بروتينات تنتجها الخلايا اللمفية B الموجودة في الجهاز المناعي، وتساعد في الدفاع عن الجسم ضد الأجسام الغريبة، التي تشمل على الفيروسات الممرضة والبكتيريا، عن طريق البحث عن الجزيئات الغريبة والارتباط بها .

* مولد المضاد (مستضد): Antigen

هو بالتحديد، أي جزيء يتعرف على جسم مضاد ويرتبط به، وعادة ما يكون هذا الجزيء المستخدم في إثارة إنتاج الجسم المضاد.

* استنّاد - التولد المضاد: Antigenicity

القدرة على التعرف بجسم مضاد والارتباط به.

* جسم مضاد مضاد لمثال التولد: Anti-idiotypic antibody

جسم مضاد يصنع استجابة لجسم مضاد آخر، ويتعرف على مثال تولده، والأجسام المضادة المضادة لمثال التولد يجري اختبارها كلقاحات محتملة.

* صبغة عادية: Autosome:

أي كروموسوم غير الكروموسومات المحددة لجنس كائن عضوي، فالإنسان علي سبيل المثال، له ٤٦ كروموسوماً، اثنان منهما (كروموسوم X وكروموسوم Y)، يحددان نوع الفرد، وبقية الكروموسومات تعتبر صبغيات عادية.

* مغذ ذاتي: Autotroph:

كائن عضوي يمكنه النمو على ثاني أكسيد الكربون، كمصدره الوحيد من الكربون.

(B)

* باشيلى ثرنجينسيس (B.T): *Bacillus thuringiensis*

نوع من البكتيريا يصيب الحشرات ويستخدم كمبيد بيولوجي حشري.

* بكتيريا: Bacteria:

كائنات عضوية صغيرة بدائية التنوي، لا توجد بها نواة، وعادة ما تكون ذات جدران خلوية صلبة، وعلى الرغم من أن بعض البكتيريا تسبب المرض للإنسان، إلا أن معظمها مفيد لكل من الطبيعة (علي سبيل المثال، تلك الأنواع من البكتيريا التي تقوم بتثبيت النتروجين أو التي تهدم المادة العضوية) ولصناعة التكنولوجيا الحيوية .

* شبه بكتيري (بكترواني): Bacteroid:

الشكل الذي تتخذه البكتيريا من جنس البكتيريا الجذرية، في العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات البقولية.

* فيروس عصوي: Baculovirus

نوع من الفيروسات يصيب الحشرات ويستخدم كمبيد بيولوجي حشري.

* ازدواج قاعدي: Base-pairing

في حلزون الـ د.ن.أ. المزدوج، ترتبط الجديلتان ببعضهما بروابط ضعيفة، التي تصل القواعد البارزة من إحدى السلاسل بقواعد السلسلة الأخرى، وتتزاوج القواعد بحيث تتصل قاعدة الأدينين بقاعدة الثيامين، وتتصل قاعدة الجوانين بقاعدة السيتوسين، وهكذا يحدد تسلسل إحدى جدائل الـ د.ن.أ. تسلسل الجديلة الأخرى.

* غسل حيوي: Bioreaching

استخدام المحاليل المحتوية على البكتيريا لإذابة واستخلاص معادن نفيسة من الخامات.

* تعدين حيوي: Biomining

استخدام البكتيريا في استخلاص معادن نفيسة من الخامات، وبما أنه يجري حاليا تكوين طرق تعدين حيوي، فعادة ما تستخدم هذه الطرق مع خامات ذات جودة منخفضة، يكون فيها استخراج المعدن بالطرق التقليدية غير مجد من الناحية الاقتصادية.

* مفاعل حيوي: Bioreactor

عبارة عن وعاء كبير أو خزان تتم فيه عملية التخمر، وتزود المفاعلات الحيوية بعدة أجهزة لمراقبة وضبط التفاعلات في الخزان، بحيث يتم التفاعل بصورة فعالة.

* تكنولوجيا حيوية: Biotechnology

استخدام كائنات عضوية حية أو مواد تصنعها كائنات عضوية حية لصنع منتجات ذات فائدة للإنسان.

* خلية لمفية B : B lymphocyte

نوع من خلايا الدم البيضاء تنتج أجسام مضادة، عندما تنشط بصورة ملائمة. وترمز B إلى كيس فابريسيوس bursa of fabricius، وهو العضو الذي تنضج فيه الخلايا داخل الدجاجة، ولا يزال العضو المشابه له في الثدييات غير معروف،

(c)

* كالوس: Callus

كتلة من الخلايا غير متميزة تتكون على جروح النبات، وتنتجها أيضاً الأنسجة النباتية النامية في مزارع الخلية النباتية.

* كربوهيدرات: Carbohydrate

مركبات بيولوجية تحتوي على الكربون والهيدروجين والأكسجين، وعادة ما ترتبط ذرة الكربون بذرتين من الهيدروجين وذرة واحدة من الأكسجين، وتشمل الكربوهيدرات السكريات البسيطة مثل الجلوكوز والجزئيات الأكثر تعقيداً، مثل النشا والسليولوز، التي تتحد فيها العديد من السكريات لتكوين بوليمرات كبيرة.

* حامل المرض: Carrier

شخص يحمل ويستطيع أن ينقل جين مرض وراثي، لكنه لا يصاب بالمرض. وتسبب الجينات المتنحية العديد من الأمراض الوراثية، والتي يجب أن يورث منها نسختان حتى تحدث الإصابة؛ وحامل المرض الذي لديه نسخة واحدة من جين متنحي، لا تظهر عليه أية أعراض للمرض.

* خلية: Cell

الوحدة الأساسية التي تتكون منها الكائنات العضوية الحية. وتتكون بعض الكائنات العضوية مثل البكتيريا من خلية واحدة فقط، في حين تتكون بعض الكائنات الأخرى كالبشر من بلايين الخلايا.

* مزارع الخلية: Cell culture

خلايا أو أنسجة نامية على مادة غذائية معينة في أطباق المعمل.

* أجسام مضادة خيمرية: Chimeric antibodies

أجسام مضادة، تتكون فيها سلاسل البروتينات الفردانية من قطع مختلفة من نوعين (من الكائنات الحية)، وأغلب التكوينات الموجودة حالياً من الإنسان والفأر.

* جبيلة اليخضور: Chloroplast

نوع من الجسيمات الغشائية توجد في الخلايا النباتية، وتعتبر مركز لعملية التمثيل الضوئي.

* فحص عينة حية من الزغبات المشيمية: Chorionic villus biopsy
هو إجراء يتم من خلاله إزالة عينة صغيرة من نسيج الزغب (الزغب أحد أغشية الجنين)، وفحصها للكشف عن التشوهات الجنينية، وخاصة تلك التشوهات الناشئة عن مصدر وراثي.

* كروماتين: Chromatin
مركب من البروتين والـ د.ن.أ، تتكون منه الكروموسومات.

* كروموسومات: Chromosomes
تركيبات شبيهة بالخيوط في نواة الخلية، تحتوي على الجينات في مصفوفة طويلة، وتحتوي كل خلية جسمية من الخلايا سليمة التنوي على مجموعة مزدوجة من الكروموسومات.

* مستنسخ: Clone
مجموعة من الخلايا المتماثلة جينياً أو الكائنات العضوية التي تنحدر جميعها بطريقة غير جنسية من نفس الفرد. (انظر أيضاً استنساخ الجين).

* كودون: Codon
تسلسل من ثلاث نكليوتيدات متتالية، يوجد في الـ د.ن.أ أو الـ ر.ن.أ، والتي إما أن يحدد حمضاً أمينياً واحداً في بروتين أو يستخدم كعلامة إشارة توقف في نهاية جين.

* عامل مساعد: Cofactor
جزء صغير أساسي للنشاط الحفزي لإنزيم.

* حماية متبادلة: Cross-protection

هي حالة تظهر عندما تصاب خلية من إحدى السلالات الفيروسية، فتحميها الإصابة بالعدوى من أن تصاب من سلالة فيروسية أخرى تنتمي لنفس نوع الفيروس.

* تدرن تاجي: Crown gall

ورم يتكون في النباتات ثنائية الفلقة بسبب عدوى من بكتيريا الأورام الزراعية، وينشأ الورم نتيجة نقل الـ د.ن.أ من بلازميد Ti من البكتيريا إلى النبات.

* مزرعة: Culture

انظر مزرعة الخلية.

(D)

* حمض ريبي نووي منقوص الأكسجين: (Deoxyribonucleic acid) DNA

أحد نوعي الحمض النووي، وهو المادة التي تتكون منها الجينات، وتتكون جديلة الـ د.ن.أ من ارتباط العديد من الوحدات البنائية الفردانية ببعضها البعض، والتي تسمى بالنكليوتيدات في جزيء كبير، ويعين التسلسل الطولي للنكليوتيدات، التسلسل الطولي للأحماض الأمينية في بروتين منتج جيني.

* ريبوز منقوص الأكسجين: Deoxyribose

سكر موجود في الأحماض النووية، وخاصة في الأحماض الريبية النووية منقوصة الأكسجين.

* نبات ثنائي الفلقة: Dicotyledonous plant
إحدى الرتبين تحت الفرعيتين الرئيسيتين، وتحتوي أجنة النباتات ثنائية الفلقة على أوراق ذات فلقتين، ومن النباتات ثنائية الفلقة: الأشجار والشجيرات والعديد من المحاصيل النباتية المعروفة مثل الطماطم والبطاطس والتبغ.

* د.ن.أ : DNA
انظر الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين.

* إنزيم بلمرة د.ن.أ : DNA polymerase
الإنزيم الذي ينسخ د.ن.أ للمادة الوراثية عندما تتضاعف قبل انقسام الخلية.

* جين سائد : Dominant gene
هو ذلك الجين الذي تكفي وراثته نسخة واحدة منه لإضفاء الصفة المحددة.

* حلزون مزدوج: Double helix
التركيب الثلاثي الأبعاد للـ د.ن.أ، الذي تلتف فيه جديلتا الجزيء معاً بشكل حلزوني منتظم.

(E)

* متماثلات الصورة: Enantiomers
مركبات تعتبر صور مرآوية من بعضها البعض، ويمكن أن توجد في مركب ترتبط فيه أربع مجموعات بديلة مختلفة بنفس ذرة الكربون.

* معزز: Enhancer

تسلسل د.ن.أ. منظم يرتبط بجين، ويعمل على زيادة نسخ هذا الجين في ر.ن.أ. الرسول.

* إنزيم: Enzyme

بروتينات تعمل كمحفزات بيولوجية، إذ تسرع من معدلات التفاعلات الكيميائية في الكائنات الحية، ومعظم الإنزيمات شديدة التخصص وتعمل في نطاق محدود جداً من الجزيئات.

* بكتيريا القولون : Escherchia coli (E. coli)

بكتيريا شهيرة، تعيش من بين أماكن أخرى في داخل القناة المعوية، وقد أجريت معظم الأبحاث الأساسية لفهم الأسس الكيميائية الحيوية للحياة على بكتيريا القولون، وتستخدم حالياً سلالات معملية من البكتيريا في التكنولوجيا الحيوية لاستنساخ الجين وصنع بروتينات مطعمة.

* خلية سوية التنوي: Eukaryote

أي كائن عضوي تكون فيه للخلايا نواة حقيقية محاطة بغشاء، وتعتبر الخلايا سليمة التنوي عادة شكلاً أكثر تطوراً من أشكال الحياة عن الخلايا بدائية التنوي.

* نشوء: Evolution

تطور أشكال جديدة للحياة من أنواع سابقة الوجود.

(F)

* حمض دهني: Fatty acid

أحماض عضوية توجد في الدهون، وأيضاً كوسائط في مسارات منتجة للطاقة مثل دورة الأحماض ثلاثية الكربوكسيل، وللأحماض الدهنية عدد من التطبيقات المتنوعة، فيمكن أن تستخدم على سبيل المثال، كعوامل مكسبة للنكهة وكمشحات.

* مواد أولية كيميائية: Feedstock chemicals

مواد كيميائية تستخدم بكميات كبيرة كمواد بادئة لتصنيع مواد كيميائية أخرى.

* تخمر: Fermentation

استخدام الكائنات المجهرية، أو في بعض الحالات الإنزيمات المستخرجة من كائنات مجهرية في إجراء أحد التفاعلات الكيميائية العديدة، والمثال التقليدي للتخمر، تحول السكر إلى كحول بواسطة الخميرة.

* مخمر: Fermentor

الخزان أو أي جهاز آخر تتم فيه تفاعلات التخمر، وعادة ما يزود المخمر بوسائل لمراقبة وضبط حالات التفاعل التي تتم بداخله.

(G)

* جين: Gene

يشفر الجين الذي يعتبر الوحدة الأساسية للوراثة عن صفة محددة يمكن أن تنتقل من جيل لجيل آخر، وبتعبير جزئي، فإن الجين يعتبر قطعة من حمض

نووي، عادة ما يكون حمضاً نووياً منقوص الأكسجين، يحدد تركيب سلسلة بروتينية واحدة.

* استنساخ الجين: Gene cloning

استخدام تكنولوجيا الـ د.ن.أ لعزل وإنتاج كميات كبيرة من جين فردي.

* مكتبة جينية: Gene library

مجموعة من مستنسخات خلوية، عادة ما تكون حالياً خلايا بكتيرية، يحتوي كل منها قطعة د.ن.أ من مصدر معين، وتتكون المكتبة الجينية، على سبيل المثال، من مستنسخات خلوية تحتوي على قطع من د.ن.أ بشري.

* علاج بالجين : Gene Therapy

علاج مرض وراثي بشري عن طريق إدخال جين جديد في المريض للقيام بوظيفة الجين المعيب الذي يسبب المرض.

* مرض وراثي: Genetic disease

مرض يسببه جين معيب، ويمكن أن ينتقل من جيل لجيل.

* هندسة وراثية: Genetic engineering

استخدام طرق الـ د.ن.أ المطعم لإضفاء صفات جديدة على الكائنات العضوية، عن طريق إدخال جينات جديدة في خلاياها.

* مجموعة العوامل الوراثية: Genome

التركيب الجيني الكامل لكائن عضوي.

* خلايا جرثومية : Germ cells

الخلايا التي ينشأ منها الحيوان المنوي في الذكور والبويضات في الإناث.

* انحلال السكر(المركبات بسيطة): Glycolysis

سلسلة من التفاعلات تبدأ بهدم جلوكوز السكر وتنتهي بإطلاق كمية صغيرة من الطاقة تستخدمها الخلية، ويحدث تخمر السكر إلى كحول في الخميرة من خلال المسار الهدمي للسكر.

* مرض رفض الطعم للعائل : Graft-versus-host disease

حالة تحدث للأشخاص الذين يجرون عمليات زرع نخاع العظم، ويسببه النخاع المنقول(الطعم) منتجاً خلايا مناعية تقوم بمهاجمة أنسجة المريض وتعتبرها أنسجة غريبة.

(H)

* هيموجلوبين: Haemoglobin

الجزء الحامل للأكسجين في خلايا الدم الحمراء، يتكون الهيموجلوبين من أربع سلاسل بروتينية: اثنتان كل منها بروتين جلوبيين ألفا، واثنتان كل منها بروتين جلوبيين بيتا، بالإضافة إلى صبغة الهيم الملونة للدم.

* مرض مورث: Hereditary disease

مرض يمكن أن ينتقل من جيل لجيل آخر ويكون بسبب جين معيب.

* مختلف الاغذاء : Heterotroph

كائن عضوي لا يستطيع أن ينم على ثاني أكسيد الكربون، ولكن يجب أن يحصل على مصادر كربونية أكثر تعقداً مثل السكريات.

* لاقحة مختلفة الصبغيات : Heterozygote

تورث الجينات في صورة أزواج، يأتي أحد الزوجين من الأم والآخر من الأب، والفرد متباين اللواقح هو الشخص الذي يتكون فيه زوج اللواقح من نوعين مختلفين من جين معين، فجين جلوبيين بيتا، على سبيل المثال، يمكن أن يتزاوج مع جين خلية منجلية.

* لاقحة متجانسة الصبغيات: Homozygote

هو الشخص الذي تكون لديه نسختا زوج جين معين متماثلتان.

* هرمون: Hormone

مادة نشطة بيولوجيا، تنتج من أحد أجزاء الجسم ويحملها الدم إلى جزء آخر حيث تحدث فيه تأثيراتها.

* تهجين: Hybridization

١- في البيولوجيا الجزيئية: هو إجراء يتم من خلاله مزج جزيئات حمض نووي وحيد الجديلة، إما من د.ن.أ أو ر.ن.أ. فإذا كان للجزيئين تركيب متماثل فإتھما يتھجنن، أي يرتبطان ببعضها البعض وفقاً لقوانين التزاوج القاعدي، ويمكن استخدام الإجراء ليقدم دليلاً عن درجة قرابة جينين، أو للكشف عن جزيئات الـ ر.ن.أ أو الـ د.ن.أ باستخدام مجس حمض نووي متخصص.

٢- تهجين نوعين لتكوين هجن لها بعض خصائص كل من الأب والأم .

* ورم هجين: Hybridoma

تصنع الخلية المهجنة بدمج خلية لمفية B منتجة للجسم المضاد مع خلية ورم نخاعي، وتعد الأورام الهجينية مصدراً للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

* إنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفروبوسيل ترانسفيراز: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)
إنزيم أساسي في تخليق الوحدات البنائية للأحماض النووية، ونقص هبرت الذي ينشأ عن جين معيب، يسبب مرض ليسك- نيهان.

* مثال التولد: Idiotype

موقع مميز لجسم مضاد معين، فمثال التولد الذي يقع بداخل أو بالقرب من مركز ارتباط مستضد لجسم مضاد، يمكنه أن يحفز بنفسه إنتاج الجسم المضاد وقد يكون له شكل متمم لشكل المستضد الذي يتعرف عليه الجسم المضاد ويرتبط به.

* استمناع: Immunogenicity

القدرة على إحداث استجابة مناعية.

* إنترفيرونات: Interferons

مجموعة من بروتينات ذات صلة لها عدة أنشطة في الجسم، وتتضمن هذه الأنشطة على مقاومة العدوى الفيروسية، وتحفيز قدرات القتل الخلوي لبعض أنواع من الخلايا المناعية، ويجري اختبار الإنترفيرونات في علاج السرطان وأعراض نقص المناعة المسمى بالإيدز.

* إنترلوكينات: Interleukins

مجموعة من البروتينات تنقل إشارات النمو والتطور بين الخلايا المناعية، وهي ضرورية من أجل زيادة الاستجابات المناعية الطبيعية، والإنترلوكين-٢، على سبيل المثال، يجري عليه تجارب إكلينيكية لعلاج السرطان والإيدز.

(L)

* هيموجلوبين بقولي: Leghaemoglobin

نوع من الهيموجلوبين يوجد في العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات البقولية، ويرتبط الهيموجلوبين البقولي بشدة بالأكسجين، وإلا فإنه يسمم الإنزيمات المثبتة للنتروجين.

* بقل: Legume

أحد أفراد مجموعة من النباتات تشتمل على البازلاء والفاصوليا والبرسيم الحجازي، وتستطيع البقوليات أن تصنع علاقات تكافلية مع البكتيريا المثبتة للنتروجين من جنس البكتيريا الجذرية.

* مرض ليسك-نيهان: Lesch-Nyhan disease

مرض وراثي يسببه جين معيب لإيزيم هيبوكسanthin-جواتين فسفوريبوسيل ترنسفيراز (HPRT)، وتتصف الحالة بتركيزات متزايدة من حمض البولييك في الدم، وأعراض عصبية تشتمل على تخلف عقلي وإجبار المريض على جدد نفسه.

* تحليل الارتباط: Linkage analysis

ارتباط تغير تركيبى معين في الـ د.ن.أ بوجود جين طافر يمكنه أن يسبب مرضاً وراثياً، ويمكن استخدام تحليل الارتباط في تشخيص الأمراض الوراثية والكشف عن حاملي الجين.

* تكرارات طرفية طويلة: Long terminal repeats (LTRs)

تسلسلات د.ن.أ مزدوجة وجدت في نهايات مجموعات العوامل الوراثية لفيروسات معينة، وهي تحمل إشارات لازمة للتعبير عن الجينات الفيروسية.

(M)

* انقسام اختزالي: Meiosis

انقسام نووي في الخلايا الجرثومية، ينشأ عنه انتصاف عدد الكروموسومات، بحيث تستقبل خلايا البويضات أو الحيوانات المنوية الناتجة مجموعة واحدة فقط من الكروموسومات، بدلاً من المجموعة المزدوجة الموجودة في كل خلية جسدية.

* ر.ن.أ رسول: Messenger RNA (mRNA)

صورة من صور ر.ن.أ تنسخ من د.ن.أ الجينات، بحيث أن تركيبه يحتوي على "رسالة" مشفرة في الجين، ويحمل ر.ن.أ الرسول هذه الرسالة إلى الريبوسومات حيث توجه تخليق البروتين.

* أيض: Metabolism

المجموع الكلي للتفاعلات الكيميائية الحيوية في الخلية.

* فتل خيطي(ميتاكوندريا): Mitochondrin
جسيم محاط بغشاء، يعتبر مركز التفاعلات الرئيسية المنتجة للطاقة في
الخلية، التي تشمل على دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل.

* انقسام فتيلي: Mitosis
انقسام نووي في الخلايا الجسدية، وقبل أن تنقسم الخلية، تتضاعف
الكروموسومات بحيث أن كل خلية وليدة ستكون تستقبل مجموعة مزدوجة
كاملة من الكروموسومات.

* جسم مضاد أحادي الاستساخ: Monoclonal antibody
جسم مضاد ينتج بواسطة مستنسخ ورم هجين، ولما كانت جميع الخلايا في
مستنسخ متماثلة، فإنها تنتج جميعاً نفس جزء الجسم المضاد، وتقدم تكنولوجيا
الجسم المضاد أحادي الاستساخ طريقة لإنتاج كميات غير محدودة من جسم
مضاد نقى.

* نبات وحيد الفلقة: Monocotyledonous plant(monocot)
أحد رتبتيين كبيرتين من النباتات، والنباتات وحيدة الفلقة أجنة ذات ورقة بزرية
واحدة(ورقة جنينية ترافق بزور الزهرات)، وينتمي إلى هذه الرتبة النجيليات
والمحاصيل الحبوبية الرئيسية والقمح والذرة والأرز. (انظر أيضاً ثنائية
الفلقة).

* تولد الطفرة: Mutagenesis
إدخال تغييرات على جينات الكائن العضوي.

* طافر: Mutant

كائن عضوي حدثت به بعض التغيرات بسبب طفر جيني.

* تبدل(طفرة): Mutation

أي تغير في د.ن. أ جين ينتج عنه بعض تغيرات في الكائن العضوي الحامل لهذا الجين.

* ورم نخاعي: Myeloma

ورم الخلايا اللمفية B المنتجة للجسم المضاد. وتستخدم خلايا الورم النخاعي في صنع ورم الهجين لإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

(N)

* جينات نف: nif genes

مركب من الجينات ضروري من أجل تثبيت النتروجين، ولا تحمل جينات نف إلا عديمة التنوي التي تضم بكتيريا معينة والطحالب الخضراء والزرقاء، غير أنه يمكن لبعض من هذه الكائنات العضوية أن تكون علاقات تكافلية حميمة مع النباتات الخضراء وخاصة البقوليات.

* نتروجيناز: Nitrogenase

مركب إنزيمي يقوم باختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا أثناء التثبيت البيولوجي للنتروجين.

* تثبيت النتروجين: Nitrogen fixation

اختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا، وهذا التفاعل الذي يتطلب قدراً كبيراً من الطاقة يمكن إجراؤه بطريقة بيولوجية أو كيميائية.

* تكون عقد أزوتية: Nodulation

تكون العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات بواسطة بكتيريا، مثل البكتيريا الجذرية، التي تكون علاقات تكافلية مع البقوليات.

* حمض نووي: Nucleic acid

جزيئات تتكون من عمود فقري من مجموعات السكر والفوسفات المتبادلة، التي تبرز منها بعض القواعد العضوية التي تتصل بمجموعات السكر، وسميت الأحماض النووية بذلك، لأنها كانت تعزل في الأصل من نوى الخلايا، وتشمل هذه الأحماض على الحمض الريبسي النووي المنقوص الأكسجين، الذي يشكل المادة الوراثية، والأحماض الريبية النووية.

* نكليوتيد: Nucleotide

جزئ يتكون من سكر مرتبط به مجموعة فوسفات وقاعدة عضوية، وتعتبر النكليوتيدات وحدات بناء الأحماض النووية.

* نواة: Nucleus

التركيب الأكثر وضوحاً داخل خلية سليمة التئوي، وتحاط النواة بغشاء وتحتوي على الكروموسومات.

* مولد ورم: Oncogene

جين يمكنه أن يجعل الخلايا تصاب بتحول سرطاني، وتعتبر مولدات الورم صور شاذة من الجينات الخلوية الطبيعية اللازمة للنمو والتميز.

(P)

* كائن ممرض: Pathogen

أي كائن مجهري أو فيروس يسبب مرض.

* ببتيد: Peptide

جزئ يتكون من وصل حمضين أميين وربما مائة حمض ببعضها البعض. (انظر أيضاً البروتين).

* تمثيل ضوئي: Photosynthesis

تحول ثاني أكسيد الكربون والماء إلى مواد كربوهيدراتية بواسطة النباتات، باستخدام الضوء كمصدر للطاقة.

* بلازميد: Plasmid

جزئ من د.ن.أ، صغير وعادة ما يكون حلقي، ويوجد في البكتيريا وليس جزء من الكروموسوم البكتيري، وقد تم اتخاذ البلازميدات التي تحمل أعداداً قليلة من الجينات كمتجهات لنقل الجينات بين الأنواع.

* مبلمر (مضاعف الأصل): Polymer

جزئ كبير يتكون من وصل العديد من الوحدات البنائية البسيطة ببعضها البعض، والبروتينات والأحماض النووية وعديد السكريات تعتبر أمثلة من المبلمرات الموجودة بصورة طبيعية.

* عديد السكريات: Polysaccharide

مواد كربوهيدراتية كبيرة تتكون من وصل العديد من جزيئات السكر ببعضها، ومثال لذلك، النشا والسليلوز.

* بدائية النواة: Prokaryote

كائنات عضوية من بينها البكتيريا، تتكون عادة من خلية وحيدة لا توجد بها نواة، وتعتبر بدائيات التنوي عادة أشكال من الحياة أقل تقدم من سليمات التنوي.

* محرض (مثير) : Promoter

تسلسل د.ن.أ منظم يكون مقترناً بجين، وهو ضروري من أجل البدء الدقيق لنسخ جين.

* بروتين: Protein

مبلمر بيولوجي يتكون من وصل عدة أحماض أمينية ببعضها، والاختلاف الأساسي بين الببتيدات والبروتينات هو الحجم، فالبروتينات عادة لها أوزان جزيئية أكبر من ١٠٠٠٠، في حين أن الأوزان الجزيئية للببتيدات أقل من ١٠٠٠٠، ومع ذلك، فقد تتداخل الفنتان، وتعمل البروتينات كإنزيمات وتساعد أيضاً على تكوين تركيبات خلوية.

* جبلة الخلية النباتية: Protoplast

خلية نباتية نزع منها جدارها السليلوزي الصلب، وتستخدم جلات الخلايا النباتية في إنتاج هجن الخلايا الجسدية، وتستخدم أيضاً كأهداف لنقل الجين في الهندسة الوراثية النباتية.

(R)

* مستقبل: Receptor

جزئ يكون عادة بروتين، يوجد على الغشاء الخارجي للخلية، ويتعرف المستقبل ويرتبط برسول ضمنخولي محدد، مثل هرمون أو عامل نمو، ومن ثم يبدأ في إحداث تأثيرات الرسول داخل الخلية.

* جين متنحي: Recessive gene

هو الجين الذي يشفر عن صفة لا تظهر إلا إذا وجدت نسختان من الجين، والعديد من الأمراض الوراثية تنشأ بسبب جينات متنحية.

* د.ن.أ مطعم: Recombinant DNA

جزئ د.ن.أ يتكون من اتحاد قطع د.ن.أ من مصدرين أو أكثر.

* بروتين مطعم: Recombinant protein

بروتين يتكون عادة في البكتيريا أو الخميرة أو الخلايا المستزرعة، كمنتج جيني في جزئ د.ن.أ مطعم، والعديد من البروتينات البشرية ذات الأهمية المحتملة إكلينيكية تصنع حالياً كبروتينات مطعمة.

* إنزيم قطع: Restriction enzyme

إنزيم بكتيري يقطع الـ د.ن.أ عند تسلسل نكليوتيدي محدد، وتستخدم إنزيمات القطع في صنع الـ د.ن.أ المطعم، ولصنع خريطة جينية، وفي تشخيص الأمراض الوراثية.

* تعدد شكل طول قطعة التحديد : Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

تغير في طول القطع الناتجة عندما يهضم إنزيم قطع عينة د.ن.أ، ويكون من نتيجته تغير في تسلسل الـ د.ن.أ. وتستخدم الـ RFLP في تشخيص الأمراض الوراثية.

* خريطة تحديد: Restriction mapping

رسم خريطة لجزئ د.ن.أ عن طريق هضمه بإنزيمات القطع، وسوف يكون لكل جزئ د.ن.أ نمطه المميز من المراكز التي تتعرف عليها الإنزيمات، ويمكن أن تستخدم الخرائط نتيجة لذلك في مقارنة قرابة جزيئات د.ن.أ من مصادر مختلفة.

* فيروس رجعي: Retrovirus

أية مجموعة من الفيروسات تكون مادتها الوراثية هي الـ ر.ن.أ بدلاً من الـ د.ن.أ، وتشمل دورات حياتها على خطوة ينسخ فيها الـ ر.ن.أ الفيروسي في الـ د.ن.أ.

* بكتيريا جذرية: Rhizobium

جنس من البكتيريا يشمل على الأنواع المثبتة للنتروجين التي تكون علاقات تكافلية مع النباتات البقولية.

* حمض الريبونكليك (ر.ن.أ) : Ribonucleic acid (RNA)
أحد الحمضين النوويين الرئيسيين، ويشبه تركيب الـ ر.ن.أ تركيب الـ د.ن.أ،
غير أنه يحتوي على ريبوز السكر بدلاً الريبوز المنقوص الأكسجين، ويشمل
الـ ر.ن.أ على ر.ن.أ الرسول، والـ ر.ن.أ الريبوسومي، والـ ر.ن.أ الناقل.

* ريبوز: Ribose
سكر يوجد في الأحماض الريبية النووية.

* ر.ن.أ ريبوسومي: Ribosomal RNA (rRNA)
نوع من الـ ر.ن.أ يجمع بين بروتينات عديدة لتكوين جسيمات ريباسية .

* جسيم ريباسي: Ribosome
جزء ضئلي يتكون من بروتينات، ور.ن.أ ريبوسومي، والجسيمات
الريباسية هي مراكز تخليق البروتين.

* فيروس رجعي: Retrovirus
أية مجموعة من الفيروسات لها مادة وراثية من الـ ر.ن.أ بدلاً من الـ
د.ن.أ، وتتضمن دورات حياتها على خطوة ينسخ فيها الـ ر.ن.أ الفيروسي
إلى د.ن.أ، ويجري تطوير الفيروسات الرجعية كي تستخدم كمتجهات لنقل
الجين.

* ر.ن.أ : RNA
انظر حمض الريبونكليك.

(S)

* أنيميا الخلية المنجلية: Sick cell anaemia
شكل وراثي من الأنيميا يسببه عيب في الجين المشفر عن بيتا-جلوبين، وهو أحد البروتينين اللذين يتكون منها الهيموجلوبين.

* بروتين كائنات وحيدة الخلية: Single-cell protein
بروتينات تنتجها كائنات وحيدة الخلية، مثل البكتيريا والفطريات والطحالب لاستخدامها في الغذاء الحيواني أو الآدمي.

* تباينات في مزارع الأنسجة: Somaclonal variation
قابلية للتغير الوراثي تحدث في التبتات التي تجددت من خلايا محفوظة في مزارع الخلايا والأنسجة، ويمكن أن تنشأ القابلية للتغير حتى في الخلايا التي جاءت في الأصل من نفس النبات ويتوقع منها أن تكون متماثلة التركيبات الوراثية.

* خلية جسدية: Somatic cell
أي نوع من خلايا كائن عضوي ما عدا الخلايا الجرثومية.

* هجين الخلية الجسدية: Somatic cell hybrid
هجين ينتج عن دمج خلايا جسدية من نوعين مختلفين، وخاصة من الأنواع النباتية.

* خلية جذعية: Stem cell

شكل غير ناضج من خلية نخاع العظم، وهي تنقسم لتكوين ذرية، يعمل البعض منها على البقاء على مجموعة الخلايا الجذعية، بينما ينتج عن البعض الآخر كل سلالات الخلايا الرئيسية التي تنشأ من نخاع العظم.

* ستيرويد (شبيهات الكوليسترول): Steroid

عضو من فئة مركبات ذات تركيب رئيسي، يحتوي على حلقة بها خمس ذرات كربون، وثلاث حلقات بكل منها ست ذرات كربون، والكوليسترول هو ستيرويد مثل هرمونات الجنس الذكرية والأنثوية وبعض الهرمونات الأخرى التي تنظم توازن الملح والماء والأيض.

* ركيزة: Substrate

مركب يؤثر عليه إنزيم، ومن ثم يحوله إلى مركب آخر.

* سكر: Sugar

شكل بسيط من الكربوهيدرات وعادة ما يكون حلو، وبعض أنواع السكر مثل الجلوكوز تعتبر مصادر طاقة للخلايا، وتعتبر أيضاً وحدات بناء لعديدات سكريات، مثل النشا والسليلوز.

* تكافل: Symbiosis

علاقة يعيش من خلالها فردان من نوعين مختلفين معاً على منفعة متبادلة، ومثال لذلك، العلاقة بين البكتيريا الجذرية المثبتة للنيتروجين والنباتات البقولية.

* خلية لمفية T : T lymphocyte

نوع من خلايا الدم البيضاء تقوم بعدة وظائف مطلوبة من أجل الاستجابات المناعية الطبيعية، وبعض الخلايا اللمفية خلايا قاتلة، حيث تقوم بتدمير الخلايا التي تتعرف عليها بأنها غريبة (الخلايا المصابة بالفيروس، على سبيل المثال)، وتعمل خلايا T أخرى كمنظمات - إما مساعدة أو كابحة - للخلايا المناعية، بما فيها الخلايا اللمفية B المنتجة للجسم المضاد، وتشير T إلى الغدة السعترية، وهي العضو الذي تنضج فيه الخلايا اللمفية T.

* فقر الدم البحري: Thalassaemia

نوع من أنيميا الوراثة الذي يسبب فيه جين معيب نقصان أو غياب كامل لأحد بروتيني جزىء الهيموجلوبين.

* ثيوباشيلص فروكسيدانز: Thiobacillus ferrooxidans

نوع من البكتيريا يستخدم في التعدين الحيوي.

* بلازميد Ti : Ti plasmid

بلازميد تحمله بكتيريا الأورام الزراعية، وتنقل البكتيريا البلازميد إلى الخلايا النباتية، حيث يعمل على تكوين التدرن التاجي، ويجري حالياً استخدام أشكال معدلة من بلازميد Ti في الهندسة الوراثية للنباتات.

* منشط نسيج مولد البلازمين: Tissue plasminogen activator (TPA)

هو إنزيم يحول نذير مولد بلازمين الخامل إلى مولد بلازمين إنزيم نشط، يعمل على إذابة جلطات الدم، والـ TPA التي تصنع بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ.

المطعم يجري اختبارها إكلينيكياً لاستخدامها في إذابة جلطات الدم المتكونة في الشرايين التاجية في المصابين بالنوبات القلبية.

* نسخ: Transcription

نسخ الجينات من د.ن.أ في ر.ن.أ الرسول، الذي يعتبر الخطوة الأولى في تعبير الجين.

* ر.ن.أ ناقل: Transfer RNA (t RNA)

نوع من الـ ر.ن.أ يلتقط الأحماض الأمينية وينقلها إلى الجسيمات الريباسية حيث يتم تخليق البروتين، ويصفها في الوضع الصحيح على ر.ن.أ الرسول، بحيث يمكن أن ترتبط ببعضها لتكوين بروتين.

* تحول: Transformation

١- إدخال جينات غريبة في الخلايا التي تكتسب نتيجة لذلك بعض الصفات المميزة.

٢- تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية.

* ببتييد عابر: Transit peptide

ببتييد يحتوى على حوالي ١٥ إلى ٢٥ ببتييداً وترتبط ببروتين، ويوجه الببتييد العابر البروتين إلى وجهته الأخيرة داخل أو خارج الخلية، ثم يزال بعد ذلك.

* انتقال: Translation

تحول تسلسل نكليوتيدي لـ ر.ن.أ رسول إلى تسلسل حمض أميني لبروتين أثناء تخليق البروتين.

* عنصر انتقالي: Transposable element

قطعة د.ن.أ يمكنها التحرك داخل مجموعة العوامل الوراثية، ويمكنها أن تحدث طفرات إذا دخلت جين، والعناصر الانتقالية التي تسمى أيضاً تراسبوزونات يجري اختبارها حالياً كمتجهات محتملة لنقل الجين.

* دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل: Tricarboxylic acid (TCA) cycle

أحد المسارات الرئيسية للأيض في الخلية، وينتج عن دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل معظم الطاقة المنبعثة أثناء هدم السكريات والدهون، وسميت الدورة بذلك نسبة إلى المركب الأول في المسار.

(V)

* لقاح: Vaccine

مستحضر يدخل في الجسم لتحفيز المناعة ضد كائن ممرض، عادة ما يكون فيروس أو بكتيريا، وتصنع معظم اللقاحات من الكائن الممرض نفسه، الذي إما أن يكون ميتاً أو موهناً، بحيث لا يمكنه أن يحدث المرض.

* متجه: Vector

في التكنولوجيا الحيوية، جزيء د.ن.أ يكون عادة بلازميد أو د.ن.أ فيروسي، يستخدم لنقل الجينات إلى الخلايا.

* فيروس: Virus

جسيمات تتكون من لب حمض نووي، التي إما أن تكون د.ن.أ أو ر.ن.أ محاطة بغلاف بروتيني، والفيروسات هي طفيليات تتناسل بدخولها للخلايا وتقوم بآلية التخليق للخلايا.

مسرد بالمصطلحات الواردة بالكتاب مع شرح واف لها، وقد رتبته حسب
الأبجدية العربية.

(أ)

- أجسام مضادة خيمرية: Chimeric antibodies
أجسام مضادة، تتكون فيها سلاسل البروتينات الفردانية من قطع مختلفة من
نوعين (من الكائنات الحية) ، وأغلب التكوينات الموجودة حالياً من الإنسان
والفأر.

- ازواج قاعدي: Base-pairing
في حلزون الـ د.ن.أ المزدوج، ترتبط الجديلتان ببعضهما بروابط
ضعيفة، التي تصل القواعد البارزة من إحدى السلاسل بقواعد السلسلة الأخرى،
وتتزوج القواعد بحيث تتصل قاعدة الأثنين بقاعدة الثيامين، وتتصل قاعدة
الجوانين بقاعدة السيتوسين، وهكذا يحدد تسلسل إحدى جدائل الـ د.ن.أ
تسلسل الجديلة الأخرى.

- استضاد- التولد المضاد: Antigenicity
القدرة على التعرف بجسم مضاد والارتباط به.

- استمناع: Immunogenicity
القدرة على إحداث استجابة مناعية.

- استنساخ الجين: Gene cloning
استخدام تكنولوجيا الـ د.ن.أ لعزل وإنتاج كميات كبيرة من جين فردي.

- إنترفيرونات: Interferons

مجموعة من بروتينات ذات صلة لها عدة أنشطة في الجسم، وتتضمن هذه الأنشطة على مقاومة العدوى الفيروسية، وتحفيز قدرات القتل الخلوي لبعض أنواع من الخلايا المناعية، ويجري اختبار الإنترفيرونات في علاج السرطان وأعراض نقص المناعة المسمى بالإيدز.

- إنترلوكينات: Interleukins

مجموعة من البروتينات تنقل إشارات النمو والتطور بين الخلايا المناعية، وهي ضرورية من أجل زيادة الاستجابات المناعية الطبيعية، والإنترلوكين-٢، على سبيل المثال، يجري عليه تجارب إكلينيكية لعلاج السرطان والإيدز.

- انتقال: Translation

تحول تسلسل نكليوتيدي لـر.ن.أ رسول إلى تسلسل حمض أميني لبروتين أثناء تخليق البروتين.

- انحلال السكر (المركبات بسيطة): Glycolysis

سلسلة من التفاعلات تبدأ بهدم جلوكوز السكر وتنتهي بإطلاق كمية صغيرة من الطاقة تستخدمها الخلية، ويحدث تخمر السكر إلى كحول في الخميرة من خلال المسار الهدمي للسكر.

- انقسام اختزالي: Meiosis

انقسام نووي في الخلايا الجرثومية، ينشأ عنه انتصاف عدد الكروموسومات، بحيث تستقبل خلايا البويضات أو الحيوانات المنوية الناتجة مجموعة واحدة

فقط من الكروموسومات، بدلاً من المجموعة المزبوجة الموجودة في كل خلية جسدية.

- انقسام فتيلي: Mitosis

انقسام نووي في الخلايا الجسدية، وقبل أن تنقسم الخلية، تتضاعف الكروموسومات بحيث أن كل خلية وليدة ستكون تستقبل مجموعة مزبوجة كاملة من الكروموسومات.

- أنيميا الخلية المنجلية: Sickle cell anaemia

شكل وراثي من الأنيميا يسببه عيب في الجين المشفر عن جلوبين بيتا، وهو أحد البروتينين اللذين يتكون منها الهيموجلوبين.

- إنزيم: Enzyme

بروتينات تعمل كمحفزات بيولوجية، إذ تسرع من معدلات التفاعلات الكيميائية في الكائنات الحية، ومعظم الإنزيمات شديدة التخصص وتعمل في نطاق محدود جداً من الجزيئات.

- إنزيم قطع: Restriction enzyme

إنزيم بكتيري يقطع الـ د.ن.أ عند تسلسل نكليوتيدي محدد، وتستخدم إنزيمات القطع في صنع الـ د.ن.أ المطعم، ولصنع خريطة جينية، وفي تشخيص الأمراض الوراثية.

- إنزيم بلمرة د.ن.أ: DNA polymerase

الإنزيم الذي ينسخ د.ن.أ للمادة الوراثية عندما تتضاعف قبل انقسام الخلية.

- إنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفروبوسيل ترانسفيراز: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)
إنزيم أساسي في تخليق للوحدات البنائية للأحماض النووية، ونقص هبرت الذي ينشأ عن جين معيب، يسبب مرض ليسك- نيهان.

- أيض: Metabolism
المجموع الكلي للتفاعلات الكيميائية الحيوية في الخلية.

(ب)

- ببتييد: Peptide
جزء يتكون من وصل حمضين أمينين وربما مائة حمض ببعضها البعض. (انظر أيضاً البروتين).

- ببتييد عابر: Transit peptide
ببتييد يحتوى على حوالي من ١٥ إلى ٢٥ ببتييداً وترتبط ببروتين، ويوجه الببتييد العابر البروتين إلى وجهته الأخيرة داخل أو خارج الخلية، ثم يزال بعد ذلك.

- بدائية النواة: Prokaryote
كائنات عضوية من بينها البكتيريا، تتكون عادة من خلية وحيدة لا توجد بها نواة، وتعتبر بدائيات النوى عادة أشكال من الحياة أقل تقدم من سليمات التنوي.

- بروتين: Protein

مبلمر بيولوجي يتكون من وصل عدة أحماض أمينية ببعضها، والاختلاف الأساسي بين الببتيدات والبروتينات هو الحجم، فالبروتينات عادة لها أوزان جزيئية أكبر من ١٠٠٠٠، في حين أن الأوزان الجزيئية للببتيدات أقل من ١٠٠٠٠. ومع ذلك، فقد تتداخل الفئتان، وتعمل البروتينات كإنزيمات وتساعد أيضاً على تكوين تركيبات خلوية.

- بروتين كائنات وحيدة الخلية: Single-cell protein

بروتينات تنتجها كائنات وحيدة الخلية، مثل البكتيريا والفطريات والطحالب لاستخدامها في الغذاء الحيواني أو الآدمي.

- بروتين مطعم: Recombinant protein

بروتين يتكون عادة في البكتيريا أو الخميرة أو الخلايا المستزرعة، كمنتج جيني في جزئ د.ن.أ. مطعم، والعديد من البروتينات البشرية ذات الأهمية المحتملة إكلينيكيًا تصنع حالياً كبروتينات مطعم.

- بزل السلي- سحب الصاء: Amniocentesis

هو إجراء يتم من خلاله سحب سائل يحتوي على خلايا جنينية من رحم امرأة حامل، بواسطة إبرة تدخل في جدار البطن، ويمكن تحليل الخلايا للبحث عن وجود علامات لبعض الأمراض الوراثية في الجنين.

- بكتيريا: Bacteria

كائنات عضوية صغيرة بدائية التنوي، لا توجد بها نواة، وعادة ما تكون ذات جدران خلوية صلبة، وعلى الرغم من أن بعض البكتيريا تسبب المرض

للإنسان، إلا أن معظمها مفيد لكل من الطبيعة (على سبيل المثال، تلك الأنواع من البكتيريا التي تقوم بتثبيت النتروجين أو التي تهدم المادة العضوية) ولصناعة التكنولوجيا الحيوية .

- بكتيريا القولون : *Escherchia coli* (E. coli)

بكتيريا شهيرة، تعيش من بين أماكن أخرى في داخل القناة المعوية، وقد أجريت معظم الأبحاث الأساسية لفهم الأسس الكيميائية الحيوية للحياة على بكتيريا القولون، وتستخدم حاليا سلالات معملية من البكتيريا في التكنولوجيا الحيوية لاستنساخ الجين وصنع بروتينات مطعمة

- بكتيريا الأورام الزراعية: *Agrobacterium tumefaciens*

نوع من البكتيريا تسبب أورام العفن التاجي في النباتات التي يصيبها، وتنشأ الأورام نتيجة اكتساب د.ن.أ منقول من بلازميد Ti من البكتيريا إلى الخلايا النباتية أثناء الإصابة، وقد تم تحويل بكتيريا الأورام الزراعية لإدخال جينات جديدة إلى المحاصيل النباتية.

- بكتيريا جذرية: *Rhizobium*

جنس من البكتيريا يشمل على الأنواع المثبتة للنتروجين التي تكون علاقات تكافلية مع النباتات البقولية.

- شبه بكتيري (بكتروائي): *Bacteroid*

الشكل الذي تتخذه البكتيريا من جنس البكتيريا الجذرية، في العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات البقولية.

- بلازميد : Plasmid

جزء من د.ن.أ، صغير وعادة ما يكون حلقي، ويوجد في البكتيريا وليس جزء من الكروموسوم البكتيري، وقد تم اتخاذ البلازميدات التي تحمل أعداد قليلة من الجينات كمتجهات لنقل الجينات بين الأنواع.

- بلازميد Ti : Ti plasmid

بلازميد تحمله بكتيريا الأورام الزراعية، وتنقل البكتيريا البلازميد إلى الخلايا النباتية، حيث يعمل على تكوين الندرن التاجي، ويجري حالياً استخدام أشكال معدلة من بلازميد Ti في الهندسة الوراثية للنباتات.

(ت)

- تباينات في مزارع الأنسجة: Somaclonal variation

قابلية للتغير الوراثي تحدث في النباتات التي تجددت من خلايا محفوظة في مزارع الخلايا والأنسجة، ويمكن أن تنشأ القابلية للتغير حتى في الخلايا التي جاءت في الأصل من نفس النبات ويتوقع منها أن تكون متماثلة التركيبات الوراثية.

- تبدل (طفرة): Mutation

أي تغير في د.ن.أ جين ينتج عنه بعض تغيرات في الكائن العضوي الحامل لهذا الجين.

- تثبيت النتروجين: Nitrogen fixation

اختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا، وهذا التفاعل الذي يتطلب قدراً كبيراً من الطاقة يمكن إجراؤه بطريقة بيولوجية أو كيميائية.

- تحليل الارتباط: Linkage analysis

ارتباط تغير تركيبى معين في الـ د.ن.أ بوجود جين طافر يمكنه أن يسبب مرضاً وراثياً، ويمكن استخدام تحليل الارتباط في تشخيص الأمراض الوراثية والكشف عن حاملي الجين.

- تحول: Transformation

١- إدخال جينات غريبة في الخلايا التي تكتسب نتيجة لذلك بعض الصفات المميزة.

٢- تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية.

تولد الطفرة: Mutagenesis

إدخال تغييرات على جينات الكائن العضوي.

- تخمر: Fermentation

استخدام الكائنات المجهرية، أو في بعض الحالات الإنزيمات المستخرجة من كائنات مجهرية في إجراء أحد التفاعلات الكيميائية العديدة، والمثال التقليدي للتخمر، تحول السكر إلى كحول بواسطة الخميرة.

- تدرن تاجي: Crown gall

ورم يتكون في النباتات ثنائية الفلقة بسبب عدوى من بكتيريا الأورام الزراعية، وينشأ الورم نتيجة نقل الـ د.ن.أ من بلازميد Ti من البكتيريا إلى النبات.

- تعدد شكل طول قطعة التحديد : Restriction fragment length polymorphism(RFLP)
تغير في طول القطع الناتجة عندما يهضم إنزيم قطع عينة د.ن.أ، ويكون من
نتيجته تغير في تسلسل الـ د.ن.أ، وتستخدم الـ RFLP في تشخيص
الأمراض الوراثية.

- تعدين حيوي: Biomining
استخدام البكتيريا في استخلاص معادن نفيسة من الخامات، وبما أنه يجري
حالياً تكوين طرق تعدين حيوي، فعادة ما تستخدم هذه الطرق مع خامات ذات
جودة منخفضة، يكون فيها استخراج المعدن بالطرق التقليدية غير مجد من
الناحية الاقتصادية.

- تكافل: Symbiosis
علاقة يعيش من خلالها فردين من نوعين مختلفين معاً على منفعة متبادلة،
ومثال لذلك، العلاقة بين البكتيريا الجذرية المثبتة للنيتروجين والنباتات
البقولية.

- تكرارات طرفية طويلة: Long terminal repeats(LTRs)
تسلسلات د.ن.أ مزدوجة وجدت في نهايات مجموعات العوامل الوراثية
لفيروسات معينة، وهي تحمل إشارات لازمة للتعبير عن الجينات الفيروسية.

- تكنولوجيا حيوية: Biotechnology
استخدام كائنات عضوية حية أو مواد تصنعها كائنات عضوية حية لصنع
منتجات ذات فائدة للإنسان.

- تكون عقد أزوتية: Nodulation

تكون العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات بواسطة بكتيريا، مثل البكتيريا الجذرية، التي تكون علاقات تكافلية مع البقوليات.

- تمثيل ضوئي: Photosynthesis

تحول ثاني أكسيد الكربون والماء إلى مواد كربوهيدراتية بواسطة النباتات، باستخدام الضوء كمصدر للطاقة.

- تهجين: Hybridization

١- في البيولوجيا الجزيئية: هو إجراء يتم من خلاله مزج جزيئات حمض نووي وحيد الجديلة، إما من د.ن.أ أو ر.ن.أ. فإذا كان للجزيئين تركيب متماثل فإتھما يتھجانان، أي يرتبطان ببعضھا البعض وفقاً لقوانين التزاوج القاعدي، ويمكن استخدام الإجراء ليقدم دليلاً عن درجة قرابة جينين، أو للكشف عن جزيئات الـ ر.ن.أ أو الـ د.ن.أ باستخدام مجس حمض نووي متخصص.

٢- تهجين نوعين لتكوين هجن لها بعض خصائص كل من الأب والأم .

(ث)

ثيوباشيلص فروكسيدانز: Thiobacillus ferrooxidans

نوع من البكتيريا يستخدم في التعدين الحيوي.

(ج)

- جبلة الخلية النباتية: Protoplast

خلية نباتية نزع منها جدارها السليلوزي الصلب، وتستخدم جبلات الخلايا النباتية في إنتاج هجن الخلايا الجسدية، وتستخدم أيضاً كأهداف لنقل الجين في الهندسة الوراثية النباتية.

- جبيلة اليخضور: Chloroplast

نوع من الجسيمات الغشائية توجد في الخلايا النباتية، وتعتبر مركزاً لعملية التمثيل الضوئي.

- جسم مضاد: Antibody

الأجسام المضادة، هي بروتينات تنتجها الخلايا اللمفية B الموجودة في الجهاز المناعي، وتساعد في الدفاع عن الجسم ضد الأجسام الغريبة، التي تشمل علي الفيروسات الممرضة والبكتيريا، عن طريق البحث عن الجزيئات الغريبة والارتباط بها .

- جسم مضاد أحادي الاستنساخ: Monoclonal antibody

جسم مضاد ينتج بواسطة مستنسخ ورم هجين، ولما كانت جميع الخلايا في مستنسخ متماثلة، فإنها تنتج جميعاً نفس جزء الجسم المضاد، وتقدم تكنولوجيا الجسم المضاد أحادي الاستنساخ طريقة لإنتاج كميات غير محدودة من جسم مضاد نقى.

- جسم مضاد مضاد لمثال التولد: Anti-idiotype antibody
جسم مضاد يصنع استجابة لجسم مضاد آخر، ويعرف على مثال تولده،
والأجسام المضادة المضادة لمثال التولد يجري اختبارها كلقاحات محتملة.

- جسيم ريباسي: Ribosome
جزء ضمني خلوي يتكون من بروتينات، ورن. أ. ريبوسومي. والجسيمات
الريباسية هي مراكز تخليق البروتين.

- جين: Gene
يشفر الجين الذي يعتبر الوحدة الأساسية للوراثة عن صفة محددة يمكن أن
تنتقل من جيل لجيل آخر، وبعبارة جزئية، فإن الجين يعتبر قطعة من حمض
نووي، عادة ما يكون حمض نووي منقوص الأكسجين، يحدد تركيب سلسلة
بروتينية واحدة.

- جين سائد: Dominant gene
هو ذلك الجين الذي تكفي وراثته نسخة واحدة منه لإضفاء الصفة المحددة.

- جين متحي: Recessive gene
هو الجين الذي يشفر عن صفة لا تظهر إلا إذا وجدت نسختان من الجين،
والعديد من الأمراض الوراثية تنشأ بسبب جينات متحية.

- جينات نف: nif genes
مركب من الجينات ضروري من أجل تثبيت النتروجين، ولا تحمل جينات نف
إلا عديمة النتوي التي تضم بكتيريا معينة والطحالب الخضراء والزرقاء، غير

أنه يمكن لبعض من هذه الكائنات العضوية أن تكون علاقات تكافلية حميمة مع النباتات الخضراء وخاصة البقوليات.

(ح)

- حامل المرض: Carrier

شخص يحمل ويستطيع أن ينقل جين مرض وراثي، لكنه لا يصاب بالمرض، وتسبب الجينات المتنحية العديد من الأمراض الوراثية، والتي يجب أن يورث منها نسختان حتى تحدث الإصابة؛ وحامل المرض الذي لديه نسخة واحدة من جين متنحي، لا تظهر عليه أية أعراض للمرض.

- حلزون مزدوج: Double helix

التركيب الثلاثي الأبعاد للـ د.ن.أ، الذي تلتف فيه جديلتا الجزيء معاً بشكل حلزوني منتظم.

- حماية متبادلة: Cross-protection

هي حالة تظهر عندما تصاب خلية من إحدى السلالات الفيروسية، فتحميها الإصابة بالعدوى من أن تصاب من سلالة فيروسية أخرى تنتمي لنفس نوع الفيروس.

- حمض أميني: Amino acid

جزيئات الوحدات البنائية، التي ترتبط ببعضها البعض لتكوين ببتيدات وبروتينات.

- حمض دهني: Fatty acid

أحماض عضوية توجد في الدهون، وأيضاً كوسائط في مسارات منتجة للطاقة مثل دورة الأحماض ثلاثية الكربوكسيل، ولأحماض الدهنية عدد من التطبيقات المتنوعة، فيمكن أن تستخدم على سبيل المثال، كعوامل مكسبة للنكهة وكمشحات.

- حمض الريبونوكليك (ر.ن.أ) : Ribonucleic acid (RNA)

أحد الحمضين النوويين الرئيسيين، ويشبه تركيب الـ ر.ن.أ تركيب الـ د.ن.أ، غير أنه يحتوي على ريبوز السكر بدلاً من الريبوز المنقوص الأكسجين، ويشمل الـ ر.ن.أ على ر.ن.أ الرسول، والـ ر.ن.أ الريبوسومي، والـ ر.ن.أ الناقل.

- حمض نووي: Nucleic acid

جزيئات تتكون من عمود فقري من مجموعات السكر والفوسفات المتبادلة، التي تبرز منها بعض القواعد العضوية التي تتصل بمجموعات السكر، وسميت الأحماض النووية بذلك، لأنها كانت تعزل في الأصل من نوى الخلايا، وتشمل هذه الأحماض على الحمض الريبوي المنقوص الأكسجين، الذي يشكل المادة الوراثية، والأحماض الريبية النووية.

(خ)

- خريطة تحديد: Restriction mapping

رسم خريطة لجزء د.ن.أ عن طريق هضمه بـ إنزيمات القطع، وسوف يكون لكل جزء د.ن.أ نمطه المميز من المراكز التي تتعرف عليها الإنزيمات، ويمكن

أن تستخدم الخرائط نتيجة لذلك في مقارنة قرابة جزيئات د.ن.أ من مصادر مختلفة،

- خلية Cell:

الوحدة الأساسية التي تتكون منها الكائنات العضوية الحية، وتتكون بعض الكائنات العضوية مثل البكتيريا من خلية واحدة فقط، في حين تتكون بعض الكائنات الأخرى كالإنسان من بلايين الخلايا.

- خلية جذعية: Stem cell

شكل غير ناضج من خلية نخاع العظم، وهي تنقسم لتكوين ذرية، يعمل البعض منها على البقاء على مجموعة الخلايا الجذعية، بينما ينتج عن البعض الآخر كل سلالات الخلايا الرئيسية التي تنشأ من نخاع العظم.

- خلية جسدية: Somatic cell

أي نوع من خلايا كائن عضوي ما عدا الخلايا الجرثومية

- خلية سوية التنوي: Eukaryote

أي كائن عضوي تكون فيه للخلايا نواة حقيقية محاطة بغشاء، وتعتبر الخلايا سليمة التنوي عادة شكلاً أكثر تطوراً من أشكال الحياة عن الخلايا بدائية التنوي.

- خلية لمفية B : B lymphocyte

نوع من خلايا الدم البيضاء تنتج أجسام مضادة، عندما تنشط بصورة ملائمة. وترمز B إلى كيس فابريسيوس bursa of fabricius، وهو العضو الذي تنضج

فيه الخلايا داخل الدجاجة، ولا يزال العضو المشابه له في الثدييات غير معروف.

(د)

- د.ن.أ : DNA

انظر الحمض الريبى النووي المنقوص الأكسجين.

- د.ن.أ مطعم : Recombinant DNA

جزئ د.ن.أ يتكون من اتحاد قطع د.ن.أ من مصدرين أو أكثر.

- دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل: Tricarboxylic acid (TCA) cycle
أحد المسارات الرئيسية للأيض في الخلية، وينتج عن دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل معظم الطاقة المنبعثة أثناء هدم السكريات والدهون، وسميت الدورة بذلك نسبة إلى المركب الأول في المسار.

(ر)

- ركيزة: Substrate

مركب يؤثر عليه إنزيم، ومن ثم يحوله إلى مركب آخر.

- ر.ن.أ : RNA

انظر حمض الريبونكليك

- ر.ن.أ رسول: Messenger RNA (mRNA)

صورة من صور ر.ن.أ تنسخ من د.ن.أ الجينات، بحيث أن تركيبه يحتوي على "رسالة" مشفرة في الجين، ويحمل ر.ن.أ الرسول هذه الرسالة إلى الريبوسومات حيث توجه تخليق البروتين.

- ر.ن.أ ريبوسومي: Ribosomal RNA (rRNA)
نوع من الـ ر.ن.أ يجمع بين بروتينات عديدة لتكوين جسيمات ريباسية .

- ر.ن.أ ناقل: Transfer RNA (t RNA)
نوع من الـ ر.ن.أ يلتقط الأحماض الأمينية وينقلها إلى الجسيمات الريباسية حيث يتم تخليق البروتين، ويصفها في الوضع الصحيح على ر.ن.أ الرسول، بحيث يمكن أن ترتبط ببعضها لتكوين بروتين.

- ريبوز منقوص الأكسجين: Deoxyribose
سكر موجود في الأحماض النووية، وخاصة في الأحماض الريبية النووية منقوصة الأكسجين.

(س)

- ستيرويد (شبهات الكوليسترول): Steroid
عضو من فئة مركبات ذات تركيب رئيسي، يحتوي على حلقة بها خمس ذرات كربون، وثلاث حلقات بكل منها ست ذرات كربون، والكوليسترول هو ستيرويد مثل هرمونات الجنس الذكرية والأنثوية وبعض الهرمونات الأخرى التي تنظم توازن الملح والماء والأيض.

- سكر: Sugar
شكل بسيط من الكربوهيدرات وعادة ما يكون حلو، وبعض أنواع السكر مثل الجلوكوز تعتبر مصادر طاقة للخلايا، وتعتبر أيضاً وحدات بناء لعديدات سكريات، مثل النشا والسليلوز.

(ص)

- صبغة عادية: Autosome

أي كروموسوم غير الكروموسومات المحددة لجنس كائن عضوي، فالإنسان علي سبيل المثال، له ٤٦ كروموسوماً، اثنان منهما (كروموسوم X وكروموسوم Y)، يحددان نوع الفرد، وبقية الكروموسومات تعتبر صبغيات عادية.

(ط)

- طافر: Mutant

كائن عضوي حدثت به بعض التغيرات بسبب طفر جيني.

(ع)

- عامل مساعد: Cofactor

جزء صغير أساسي للنشاط الحفزي لإنزيم.

- عديد السكريات: Polysaccharide

مواد كربوهيدراتية كبيرة تتكون من وصل العديد من جزيئات السكر ببعضها، ومثال لذلك، النشا والسليلوز.

- علاج بالجين : Gene Therapy

علاج مرض وراثي بشري عن طريق إدخال جين جديد في المريض للقيام بوظيفة الجين المعيب الذي يسبب المرض.

- عنصر انتقالي: Transposable element
قطعة دن.أ يمكنها التحرك داخل مجموعة العوامل الوراثية، ويمكنها أن تحدث طفرات إذا دخلت جين، والعناصر الانتقالية التي تسمى أيضاً تراسبوزونات يجري اختبارها حالياً كمتجهات محتملة لنقل الجين.

(غ)

- غسل حيوي: Bioleaching
استخدام المحاليل المحتوية على البكتيريا لإذابة واستخلاص معادن نفيسة من الخامات.

(ف)

- فتل خيطي(ميتاكوندريا): Mitochondrion
جسيم محاط بغشاء، يعتبر مركز التفاعلات الرئيسية المنتجة للطاقة في الخلية، التي تشمل على دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل.

- فحص عينة حية من الزغبات المشيمية: Chorionic villus biopsy
هو إجراء يتم من خلاله إزالة عينة صغيرة من نسيج الزغب (الزغب أحد أغشية الجنين)، وفحصها للكشف عن التشوهات الجنينية، وخاصة تلك التشوهات الناشئة عن مصدر وراثي.

- فقر الدم البحري: Thalassaemia
نوع من أنيميا الوراثة الذي يسبب فيه جين معيب نقصان أو غياب كامل لأحد بروتيني جزىء الهيموجلوبين.

- فيروس: Virus

جسيمات تتكون من لب حمض نووي، التي إما أن تكون د.ن.أ أو ر.ن.أ محاطة بغلاف بروتيني، والفيروسات هي طفيليات تتناسل بدخولها للخلايا وتقوم بالآلية التخليقية للخلايا.

- فيروس رجعي: Retrovirus

أية مجموعة من الفيروسات تكون مادتها الوراثية هي الـ ر.ن.أ بدلاً من الـ د.ن.أ، وتشمل دورات حياتها على خطوة ينسخ فيها الـ ر.ن.أ الفيروسي في الـ د.ن.أ.

- فيروس عصوي: Baculovirus

نوع من الفيروسات يصيب الحشرات ويستخدم كمبيد بيولوجي حشري.

(ك)

- كائن ممرض: Pathogen

أي كائن مجهري أو فيروس يسبب مرض.

- كالوس: Callus

كتلة من الخلايا غير متميزة تتكون على جروح النبات، وتنتجها أيضاً الأسجة النباتية النامية في مزارع الخلية النباتية.

- كربوهيدرات: Carbohydrate

مركبات بيولوجية تحتوي على الكربون والهيدروجين والأكسجين، وعادة ما ترتبط ذرة الكربون بذرتين من الهيدروجين وذرة واحدة من الأكسجين،

وتشمل الكربوهيدرات السكريات البسيطة مثل الجلوكوز والجزينات الأكثر تعقيداً، مثل النشا والسليلوز، التي تتحد فيها العديد من السكريات لتكوين بوليمرات كبيرة.

- كروماتين: Chromatin

مركب من البروتين والـ د.ن.أ، تتكون منه الكروموسومات.

- كروموسومات: Chromosomes

تركيبات شبيهة بالخيوط في نواة الخلية، تحتوي على الجينات في مصفوفة طويلة، وتحتوي كل خلية جسدية من الخلايا سليمة التنوي على مجموعة مزدوجة من الكروموسومات.

- كودون: Codon

تسلسل من ثلاث نكليوتيدات متتالية، يوجد في الـ د.ن.أ أو الـ ر.ن.أ، والتي إما أن يحدد حمضاً أمينياً واحداً في بروتين أو يستخدم كعلامة إشارة توقف في نهاية جين.

(ل)

- لاقحة مختلفة الصبغيات : Heterozygote

تورث الجينات في صورة أزواج، يأتي أحد الزوجين من الأم والآخر من الأب، والفرد متباين اللواقح هو الشخص الذي يتكون فيه زوج اللواقح من نوعين مختلفين من جين معين، فجين جلوبين بيتا، على سبيل المثال، يمكن أن يتزاوج مع جين خلية منجلية.

- لاقحة متجانسة الصبغيات: Homozygote
هو الشخص الذي تكون لديه نسختا زوج جين معين متماثلتان.

- لقاح: Vaccine
مستحضر يدخل في الجسم لتحفيز المناعة ضد كائن ممرض، عادة ما يكون فيروس أو بكتيريا، وتصنع معظم اللقاحات من الكائن الممرض نفسه، الذي إما أن يكون ميتاً أو موهناً، بحيث لا يمكنه أن يحدث المرض.

(م)

- متجه: Vector
في التكنولوجيا الحيوية، جزيء د.ن.أ يكون عادة بلازميد أو د.ن.أ فيروسي، يستخدم لنقل الجينات إلى الخلايا.

- مختلف الاغذاء : Heterotroph
كائن عضوي لا يستطيع أن ينم على ثاني أكسيد الكربون، ولكن يجب أن يحصل على مصادر كربونية أكثر تعقداً مثل السكريات.

- متماثلات الصورة: Enantiomers
مركبات تعتبر صور مرآوية من بعضها البعض، ويمكن أن توجد في مركب ترتبط فيه أربع مجموعات بديلة مختلفة بنفس ذرة الكربون.

- مثال التولد: Idiotype
موقع مميز لجسم مضاد معين، فمثال التولد الذي يقع بداخل أو بالقرب من مركز ارتباط مستضد لجسم مضاد، يمكنه أن يحفز بنفسه إنتاج الجسم المضاد

وقد يكون له شكل متمم لشكل المستنضد الذي يتعرف عليه الجسم المضاد ويرتبط به.

مجموعة العوامل الوراثية: Genome
التركيب الجيني الكامل لكائن عضوي.

- محرض: Promoter

تسلسل د.ن.أ. منظم يكون مقترناً بجين، وهو ضروري من أجل البدء الدقيق لنسخ جين.

- مخمر: Fermentor

الخزان أو أي جهاز آخر تتم فيه تفاعلات التخمر، وعادة ما يزود المخمر بوسائل لمراقبة وضبط حالات التفاعل التي تتم بداخله.

- مرض رفض الطعم للعلل: Graft-versus-host disease

حالة تحدث للأشخاص الذين يجرون عمليات زرع نخاع العظم، ويسببه النخاع المنقول (الطعم) منتجاً خلايا مناعية تقوم بمهاجمة أنسجة المريض وتعتبرها أنسجة غريبة.

- مرض ليسك-نيهان: Lesch-Nyhan disease

مرض وراثي يسببه جين معيب لإنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفوريبوسيل ترانسفيراز (HPRT)، وتتصف الحالة بتركيزات متزايدة من حمض البوليك في الدم، وأعراض عصبية تشتمل على تخلف عقلي وإجبار المريض على جدد نفسه.

- مرض مورث: Hereditary disease
مرض يمكن أن ينتقل من جيل لجيل آخر ويكون بسبب جين معيب.

- مرض وراثي: Genetic disease
مرض يسببه جين معيب، ويمكن أن ينتقل من جيل لجيل.

- مزرعة: Culture
انظر مزرعة الخلية.

- مزرعة الخلية: Cell culture
خلايا أو أنسجة نامية على مادة غذائية معينة في أطباق المعمل.

- مستقبل: Receptor
جزء يكون عادة بروتين، يوجد على الغشاء الخارجي للخلية، ويتعرف المستقبل ويرتبط برسول ضمن خلوي محدد، مثل هرمون أو عامل نمو، ومن ثم يبدأ في إحداث تأثيرات الرسول داخل الخلية.

- مستنسخ: Clone
مجموعة من الخلايا المتماثلة جينياً أو الكائنات العضوية التي تنحدر جميعها بطريقة غير جنسية من نفس الفرد. (انظر أيضاً استنساخ الجين).

- مضاد حيوي: Antibiotic
أي مجموعة من مواد كيميائية متنوعة من حيث التركيب، تنتجها كائنات مجهرية تشمل على البكتيريا والفطريات، التي تقتل الكائنات المجهرية الأخرى،

وتستخدم المضادات الحيوية في علاج الأمراض البكتيرية، وثبتت فاعلية بعض المضادات الحيوية في العلاج الكيماوي للسرطان.

- معزز: Enhancer

تسلسل د.ن.أ. منظم يرتبط بجين، ويعمل على زيادة نسخ هذا الجين في ر.ن.أ. الرسول.

- مغذ ذاتي: Autotroph

كائن عضوي يمكنه النمو على ثاني أكسيد الكربون، كمصدره الوحيد من الكربون.

- مفاعل حيوي: Bioreactor

عبارة عن وعاء كبير أو خزان تتم فيه عملية التخمير، وتزود المفاعلات الحيوية بعدة أجهزة لمراقبة وضبط التفاعلات في الخزان، بحيث يتم التفاعل بصورة فعالة.

- مكتبة جينية: Gene library

مجموعة من مستنسخات خلوية، عادة ما تكون حالياً خلايا بكتيرية، يحتوي كل منها قطعة د.ن.أ. من مصدر معين، وتتكون المكتبة الجينية، على سبيل المثال، من مستنسخات خلوية تحتوي على قطع من د.ن.أ. بشري.

- منشط نسيج مولد البلازمين: Tissue plasminogen activator (TPA)

هو إنزيم يحول نذير مولد بلازمين الخامل إلى مولد بلازمين إنزيم نشط، يعمل على إذابة جلطات الدم، والـ TPA التي تصنع بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ.

المطعم يجري اختبارها إكلينيكياً لاستخدامها في إذابة جلطات الدم المتكونة في الشرايين التاجية في المصابين بالنوبات القلبية.

- مواد أولية كيميائية: Feedstock chemicals
مواد كيميائية تستخدم بكميات كبيرة كمواد بادئة لتصنيع مواد كيميائية أخرى.

- مولد المضاد (مستضد): Antigen
هو بالتحديد، أي جزيء يتعرف على جسم مضاد ويرتبط به، وعادة ما يكون هذا الجزيء المستخدم في إثارة إنتاج الجسم المضاد.

- مولد ورم: Oncogene
جين يمكنه أن يجعل الخلايا تصاب بتحول سرطاني، وتعتبر مولدات الورم صور شاذة من الجينات الخلوية الطبيعية اللازمة للنمو والتميز.

(ن)

- نبات ثنائي الفلقة: Dicotyledonous plant
إحدى الرتبتين تحت الفرعيتين الرئيسيتين، وتحتوي أجنة النباتات ثنائية الفلقة على أوراق ذات فلقنتين. ومن النباتات ثنائية الفلقة: الأشجار والشجيرات والعديد من المحاصيل النباتية المعروفة مثل الطماطم والبطاطس والتبغ.

- نبات وحيد الفلقة: Monocotyledonous plant (monocot)
أحد رتبتين كبيرتين من النباتات، وللنباتات وحيدة الفلقة أجنة ذات ورقة بزرية واحدة (ورقة جنينية ترافق بزور الزهريات)، وينتمي إلى هذه الرتبة النجيليات ومحاصيل الحبوب الرئيسة والقمح والذرة والأرز. (انظر أيضاً ثنائية الفلقة).

- نتروجيناز : Nitrogenase

مركب إنزيمي يقوم باختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا أثناء التثبيت البيولوجي للنتروجين.

- نسخ : Transcription

نسخ الجينات من د.ن.أ في ر.ن.أ الرسول، الذي يعتبر الخطوة الأولى في تعبير الجين.

- نشوء : Evolution

تطور أشكال جديدة للحياة من أنواع سابقة الوجود.

- نقص إنزيم أدينوزين ديأميناز : Adenosine deaminase deficiency

مرض وراثي، يتسبب عن نقص إنزيم أدينوزين ديأميناز ويؤدي إلى فقد شديد في الاستجابة المناعية التي عادة ما تكون مميتة في السنوات القلائل الأولى من العمر، ويحتمل أن يكون هذا المرض من الأمراض المرشحة للمحاولات الأولى العلاج بالجين.

- نكليوتيد : Nucleotide

جزء يتكون من سكر مرتبط به مجموعة فوسفات وقاعدة عضوية، وتعتبر النكليوتيدات وحدات بناء الأحماض النووية.

- نواة : Nucleus

التركيب الأكثر وضوحاً داخل خلية سليمة التنوي، وتحاط النواة بغشاء وتحتوي على الكروموسومات.

(هـ)

- هجين خلوية جسدية: Somatic cell hybrid
هجين ينتج عن دمج خلايا جسدية من نوعين مختلفين، وخاصة من الأنواع النباتية.

- هرمون: Hormone
مادة نشطة بيولوجيا، تنتج من أحد أجزاء الجسم ويحملها الدم إلى جزء آخر حيث تحدث فيه تأثيراتها.

- هندسة وراثية: Genetic engineering
استخدام طرق الـ د.ن.أ.المطعم لإضفاء صفات جديدة على الكائنات العضوية، عن طريق إدخال جينات جديدة في خلاياها.

- هيموجلوبين: Haemoglobin
الجزء الحامل للأكسجين في خلايا الدم الحمراء، يتكون الهيموجلوبين من أربع سلاسل بروتينية: اثنتان كل منها بروتين جلوبيين ألفا، واثنتان كل منها بروتين جلوبيين بيتا، بالإضافة إلى صبغة الهيم الملونة للدم.

- هيموجلوبين بقولي: Leghaemoglobin
نوع من الهيموجلوبين يوجد في العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات البقولية، ويرتبط الهيموجلوبين البقولي بشدة بالأكسجين، وإلا فإنه يسمم الإنزيمات المثبتة للنتروجين.

(و)

- ورم نخاعي: Myeloma

ورم الخلايا اللمفية B المنتجة للجسم المضاد، وتستخدم خلايا الورم النخاعي في صنع ورم الهجين لإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

- ورم هجين: Hybridoma

تصنع الخلية المهجنة بدمج خلية لمفية B منتجة للجسم المضاد مع خلية ورم نخاعي، وتعد أورام الهجين مصدراً للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

المؤلفون المشاركون في الكتاب

- ألان أكياما Alan Akiyama
قسم الكيمياء، جامعة هارفارد .
- تمر بركاى Tamar Barkay
وكالة حماية البيئة/الولايات المتحدة معمل الأبحاث
البيئية بالولايات المتحدة.
- ال و. بوركوين Al W. Bourquin
وكالة حماية البيئة/ معمل أبحاث البيئة بالولايات
المتحدة.
- ديب شاترجى Deb Chatterjee
قسم النبات، جامعة نوتجهايم بالمملكة المتحدة.
- ستيفن كوسكى Stephen Cuskey
وكالة حماية البيئة/ معمل الأبحاث البيئية بالولايات
المتحدة.
- روبرت ت. فرالى Robert T. Fraley
شركة موسانتو، سانت لويس، ميسورى بالولايات
المتحدة.
- ل. بازيك جاج L. Patrick Gage
هوفمان-لا روش، ننتلى، نيوجرسى بالولايات المتحدة

Fred Genthren فريد جينثرين
وكالة حماية البيئة، معمل الأبحاث البيئية، فلوريدا
بالولايات المتحدة.

Bruno Gronenborn بورنو جروننبورن
معهد ماكس بلانك، جمهورية ألمانيا الفيدرالية

Ralph Hardy رالف هاردى
مؤسسة بيوتكنيكا إنترناشيونال بالولايات المتحدة.

Randolph T. Hatch راندولف ت. هاتش
مؤسسة بيوتكنيكا إنترناشيونال، الولايات المتحدة

Andrew W.B. Johnston أندروب. ب. جونسون
معهد جون أنس، المملكة المتحدة

Richard A. Lerner ريتشارد أ. لرنر
معهد أبحاث سكريس كلينك، كاليفورنيا، الولايات
المتحدة

John H. Litchfield جون هـ. ليتشفيلد
معامل كولومبس بالولايات المتحدة

Jean L. Marx جين ل. ماركس
أخبار الأبحاث والعلوم، واشنطن دي سي بالولايات
المتحدة

Saul L. Neidleman	سول ل. نيدلمان
مؤسسة سيتوس، كاليفورنيا، الولايات المتحدة	
Jozeph G. Perpich	جوزيف ج. بربيش
معهد هوارد هوجز الطبي، مرييلاند، الولايات المتحدة	
Douglas E. Rawling	دوجلاس إ. راولنج
قسم الميكروبيولوجي، جامعة كيب تاون، جنوب أفريقيا	
Jozeph Schell	جوزيف سكل
معهد ماكس بلانك، جمهورية ألمانيا الفيدرالية	
Tomas M. Shinnick	توماس م. شنك
معمل أمراض هازنز، مراكز مراقبة الأمراض، أتلانتا، جورجيا بالولايات المتحدة	
Ethan S. Simon	إيثان س. سيمون
قسم الكيمياء، جامعة هارفارد، كمبردج، ماساشوسيتس ، الولايات المتحدة	
Ronald Walter	رونالد والتر
وكالة حماية البيئة، معمل الأبحاث البيئية بالولايات المتحدة	

جورج وايتايدز

George Whitesides

قسم الكيمياء، جامعة هارفارد ،كمبريدج،ماساشوستس
،الولايات المتحدة

ديفيد وودز

David Woods

قسم الميكروبولجي،مبنى البيولوجيا الجزيئية ،جامعة
كيب تاون جنوب أفريقيا

بيت واى كان

Yuet Wai Kan

قسم الطب والمعهد هوارد هجز الطبى،جامعة
كاليفورنيا،سان فرانسيسكو،كاليفورنيا ،الولايات المتحدة

التعريف بالمترجم

هاشم أحمد محمد : حصل على بكالوريوس الهندسة المدنية عام ١٩٧٥.

صدر له عدة كتب منها :

١. قراءة فى مستقبل العالم ، وفاز بجائزة السيدة سوزان مبارك سنة ١٩٩٦.
٢. معجم التكنولوجيا الحيوية ، من سلسلة الألف كتاب الثانية سنة ١٩٩٦
٣. موسوعة كنوز المعرفة فى أسئلة وأجوبة ، من سلسلة العلم والحياة
الهيئة العامة للكتاب سنة ١٩٩٨.
٤. ترجمة كتاب حروب المياه ضمن المشروع القومى للترجمة - المجلس
الأعلى للثقافة .
٥. ترجمة القوى الأساسية الأربع فى الكون ، ضمن المشروع القومى
للترجمة - المجلس الأعلى للثقافة .
٦. شارك فى ترجمة موسوعة الطفل التى أصدرتها الهيئة العامة للكتاب سنة
١٩٩٩

المراجع:

د. إبراهيم عبد المقصود إبراهيم، تخرج في كلية زراعة عين شمس عام ١٩٧٠، وحصل على درجة الدكتوراه في الكيمياء الحيوية عام ١٩٨٦، ويعمل حالياً رئيس نشاط زراعة الأنسجة بمشروع مصر-كاليفورنيا بكلية زراعة جامعة القاهرة، ومشرف على معامل زراعة الأنسجة النباتية بوزارة الزراعة.

المحتويات

صفحة	الموضوع
٥	مقدمة للدكتور إبراهيم عبد المقصود إبراهيم
١١	مقدمة المترجم
١٦	تقديم : جون كندرو
١٧	١ الفصل الأول الوراثة والجينات والـ — د.ن.أ
	جين ل. ماركس
٦٠	٢ الفصل الثاني تخليق بدون خلايا
	٣ إيتان س.سيمون، ألان أكياما وجورج هوايتسايدز
١٠١	الفصل الثالث الكائنات المجهرية مصادر للمواد الأولية الكيميائية
	راندولف ت. هاتش ورالف هاردي
١٣٨	٤ الفصل الرابع استنساخ الجين يفتح جبهة جديدة في مجال الصحة
	ل. باتريك جيج
١٨٥	٥ الفصل الخامس الإنتاج الميكروبي للمواد الكيميائية الحيوية
	سول ل. نيللمان
٢٢٤	٦ الفصل السادس بروتينات من كائنات وحيدة الخلية
	جون هـ. ليتشفيلد
٢٥٧	٧ الفصل السابع الغسل البكتيري والتعدين الحيوي
	دافيد وودز ودوجلاس أيه. راولنجز
٢٨٦	٨ الفصل الثامن البكتيريا والبيئة
	مار باركاي، ديب شاترجي و أ.و. بوركوين
٣١٤	٩ الفصل التاسع التثبيت البيولوجي للنتروجين
	أندرو و. جونستون

٣٥٨	زراعة الخلايا والأنسجة النباتية	١٠ الفصل العاشر
	إدوارد سي. كوكنج	
٣٩٤	تحسين المحاصيل النباتية عن طريق إدخال جينات معزولة	١١ الفصل الحادي عشر
	جوزيف سكيل، برونو جرونينبورن وروبرت ت. فرالي	
٤٣٧	الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ وتطبيقاتها	١٢ الفصل الثاني عشر
	جين ماركس	
٤٨٠	الأجسام المضادة الموجهة الموقع في البيولوجيا والطب	١٣ الفصل الثالث عشر
	توماس م. شينيك وريتشارد أ. لرنر	
٥١٧	طرق جديدة لتشخيص الأمراض الوراثية	١٤ الفصل الرابع عشر
	بيت واي كان	
٥٦٢	مستقبل العلاج بالجين للأمراض الوراثية البشرية	١٥ الفصل الخامس عشر
	جين ماركس	
٥٩٨	التقنية الحيوية والتنافس الدولي والاستراتيجيات التنظيمية	١٦ الفصل السادس عشر
	جوزيف ج. بيريك	
٦٤٢	مسرد بالمصطلحات الواردة بالكتاب مرتبة طبقاً للأبجدية الإنجليزية	١٧
٦٧٢	مسرد بالمصطلحات الواردة بالكتاب مرتبة طبقاً للأبجدية العربية	١٨
٧٠١	المشاركون في الكتاب	١٩

المشروع القومى للترجمة

المشروع القومى للترجمة مشروع تنمية ثقافية بالدرجة الأولى ، ينطلق من الإيجابيات التى حققتها مشروعات الترجمة التى سبقته فى مصر والعالم العربى ويسعى إلى الإضافة بما يفتح الأفق على وعود المستقبل، معتمداً المبادئ التالية :

- ١- الخروج من أسر المركزية الأوروبية وهيمنة اللغتين الإنجليزية والفرنسية .
- ٢- التوازن بين المعارف الإنسانية فى المجالات العلمية والفنية والفكرية والإبداعية .
- ٣- الانحياز إلى كل ما يؤسس لأفكار التقدم وحضور العلم وإشاعة العقلانية والتشجيع على التجريب .
- ٤- ترجمة الأصول المعرفية التى أصبحت أقرب إلى الإطار المرجعى فى الثقافة الإنسانية المعاصرة، جنباً إلى جنب المنجزات الجديدة التى تضع القارئ فى القلب من حركة الإبداع والفكر العالميين .
- ٥- العمل على إعداد جيل جديد من المترجمين المتخصصين عن طريق ورش العمل بالتنسيق مع لجنة الترجمة بالمجلس الأعلى للثقافة .
- ٦- الاستعانة بكل الخبرات العربية وتنسيق الجهود مع المؤسسات المعنية بالترجمة .

المشروع القومي للترجمة

أحمد درويش	جون كوين	اللغة العليا	١-٨
أحمد فؤاد بليغ	ك. مادهو بانيكار	الوثنية والإسلام (ط١)	٢-٨
شوقي جلال	جورج جيمس	التراث المسروق	٣-٨
أحمد الحضرى	انجا كارتنيكوف	كيف تتم كتابة السيناريو	٤-٨
محمد علاء الدين منصور	إسماعيل فصيح	ثريا فى غيبوبة	٥-٨
سعد مصلوح ووفاء كامل فايد	ميلكا إفتيش	اتجاهات البحث اللساني	٦-٨
يوسف الأنطكى	لوسيان غولدمان	العلوم الإنسانية والفلسفة	٧-٨
مصطفى ماهر	ماكس فريش	مشعلو الحرائق	٨-٨
محمود محمد عاشور	أندرو. س. جودى	التغيرات البيئية	٩-٨
محمد معتمد وعبد الجليل الأزدي وعمر حلى	جيرار جينيت	خطاب الحكاية	١٠-٨
هناء عبد الفتاح	فيسوافا شيمبوريسكا	مختارات شعرية	١١-٨
أحمد محمود	ديفيد براونستون وأيرين فرانك	طريق الحرير	١٢-٨
عبد الوهاب علوب	روبرتسن سميث	ديانة الساميين	١٣-٨
حسن المودن	جان بيلمان نويل	التحليل النفسى للأدب	١٤-٨
أشرف رفيق عفيفى	إدوارد لوسى سميث	الحركات الفنية منذ ١٩٤٥	١٥-٨
يشارف: أحمد عثمان	مارتن برنال	أثنية السوداء (ج١)	١٦-٨
محمد مصطفى بدوى	فيليب لاركين	مختارات شعرية	١٧-٨
طلعت شاهين	مختارات	الشعر النسائى فى أمريكا اللاتينية	١٨-٨
نعيم عطية	جورج سفيريس	الأعمال الشعرية الكاملة	١٩-٨
يمنى طريف الخولى و بدوى عبد الفتاح	ج. ج. كراوثر	قصة العلم	٢٠-٨
ماجدة العناني	صمد بهرنجى	خوخة وألف خوخة وقصص أخرى	٢١-٨
سيد أحمد على الناصرى	جون أنتيس	مذكرات رحالة عن المصريين	٢٢-٨
سعيد توفيق	هانز جيورج جادامر	تجلى الجميل	٢٣-٨
بكر عباس	باتريك بارندر	ظلال المستقبل	٢٤-٨
إبراهيم الدسوقي شتا	مولانا جلال الدين الرومى	مثنوى	٢٥-٨
أحمد محمد حسين هيكل	محمد حسين هيكل	دين مصر العام	٢٦-٨
يشارف: جابر عصفور	مجموعة من المؤلفين	التنوع البشرى الخلاق	٢٧-٨
منى أبو سنة	جون لوك	رسالة فى التسامح	٢٨-٨
بدر الديب	جيمس ب. كارس	الموت والوجود	٢٩-٨
أحمد فؤاد بليغ	ك. مادهو بانيكار	الوثنية والإسلام (ط٢)	٣٠-٨
عبد الستار الطوجى وعبد الوهاب علوب	جان سوفاجيه - كلود كاين	مصادر دراسة التاريخ الإسلامى	٣١-٨
مصطفى إبراهيم فهمى	ديفيد روب	الانقراض	٣٢-٨
أحمد فؤاد بليغ	أ. ج. هويكنز	التاريخ الاقتصادى لأفريقيا الغربية	٣٣-٨
حصه إبراهيم المنيف	روجر آلن	الرواية العربية	٣٤-٨
خليل كلفت	بول ب. ديكسون	الأسطورة والحداثة	٣٥-٨
حياة جاسم محمد	والاس مارتن	نظريات السرد الحديثة	٣٦-٨

جمال عبد الرحيم	بريجيت شيفر	واحة سيوة وموسيقاها	٣٧-
أنور مغيث	ألن تورين	نقد الحداثة	٣٨-
منيرة كروان	بيتر والكوت	الحسد والإغريق	٣٩-
محمد عيد إبراهيم	آن سكستون	قصائد حب	٤٠-
عاطف أحمد وإبراهيم فتحى ومحمود ماجد	بيتر جران	ما بعد المركزية الأوروبية	٤١-
أحمد محمود	بنجامين باربر	عالم ماك	٤٢-
المهدى أخريف	أوكتايفو باث	اللهب المزوج	٤٣-
مارلين تادرس	ألدوس هكسلى	بعد عدة أصياف	٤٤-
أحمد محمود	روبرت بينا وجون فاين	التراث المغنور	٤٥-
محمود السيد على	بابلو نيرودا	عشرون قصيدة حب	٤٦-
مجاهد عبد المنعم مجاهد	رينيه ويليك	تاريخ النقد الأدبى الحديث (ج١)	٤٧-
ماهر جويجاتى	فرانسوا دوما	حضارة مصر الفرعونية	٤٨-
عبد الوهاب علوب	ه. ت. نورييس	الإسلام فى البلقان	٤٩-
محمد براءة وعثمانى الميلود ويوسف الأنطكى	جمال الدين بن الشيوخ	ألف ليلة وليلة أو القول الأسير	٥٠-
محمد أبو العطا	داريو بيانوبيا وخ. م. بيناليستى	مسار الرواية الإسبانو أمريكية	٥١-
لطفي فطيم وعادل دمرداش	ب. نوفاليس وس. روجسيفيتز وروجر بيل	العلاج النفسى التدميمى	٥٢-
مرسى سعد الدين	أ. ف. ألنجنون	الدراما والتعليم	٥٣-
محسن مصباحى	ج. مايكل والتون	المفهوم الإغريقى للمسرح	٥٤-
على يوسف على	جون بولكنجهوم	ما وراء العلم	٥٥-
محمود على مكى	فديريكو غرسية لوركا	الأعمال الشعرية الكاملة (ج١)	٥٦-
محمود السيد و ماهر البطوطى	فديريكو غرسية لوركا	الأعمال الشعرية الكاملة (ج٢)	٥٧-
محمد أبو العطا	فديريكو غرسية لوركا	مسرحياتنا	٥٨-
السيد السيد سهيم	كارلوس مونتيث	المحيرة (مسرحية)	٥٩-
صبرى محمد عبد الغنى	جوهانز إيتن	التصميم والشكل	٦٠-
بإشراف : محمد الجوهري	شارلوت سيمور - سميت	موسوعة علم الإنسان	٦١-
محمد خير البقاعى	رولان بارت	لذة النص	٦٢-
مجاهد عبد المنعم مجاهد	رينيه ويليك	تاريخ النقد الأدبى الحديث (ج٢)	٦٣-
رمسيس عوض	آلان وود	برتراند راسل (سيرة حياة)	٦٤-
رمسيس عوض	برتراند راسل	فى مدح الكسل ومقالات أخرى	٦٥-
عبد اللطيف عبد الحليم	أنطونيو جالا	خمس مسرحيات أندلسية	٦٦-
المهدى أخريف	فرناندو بيسوا	مختارات شعرية	٦٧-
أشرف الصباغ	فالنتين راسبوتين	فتاشا العجوز وقصص أخرى	٦٨-
أحمد فؤاد متولى وهويدا محمد فهمى	عبد الرشيد إبراهيم	العالم الإسلامى فى أول القرن العشرين	٦٩-
عبد الحميد غلاب وأحمد حشاد	أوخينيو تشانج رودريجت	ثقافة وحضارة أمريكا اللاتينية	٧٠-
حسين محمود	داريو فو	السيدة لا تصلح إلا للرمى	٧١-
فؤاد مجلى	ت. س. إليوت	السياسى العجوز	٧٢-
حسن ناظم وعلى حاكم	جين ب. تومبكنز	نقد استجابة القارئ	٧٣-
حسن بيومى	ل. ا. سيمينوفا	صلاح الدين والمعاليك فى مصر	٧٤-

أحمد درويش	أندريه مورو	فن التراجم والسير الذاتية	٧٥-
عبد المقصود عبد الكريم	مجموعة من المؤلفين	چاك لاكان وإغواء التحليل النفسي	٧٦-
مجاهد عبد المنعم مجاهد	رينيه ويليك	تاريخ النقد الأدبي الحديث (ج٣)	٧٧-
أحمد محمود ونورا أمين	رونالد رويرتسون	العولمة : النظرية الاجتماعية والثقافة الكونية	٧٨-
سعيد الفانمي وناصر حلاوي	بوريس أوسبنسكي	شعرية التأليف	٧٩-
مكارم القمري	ألكسندر بوشكين	بوشكين عند «نافورة الدموع»	٨٠-
محمد طارق الشرقاوي	بندكت أندرسن	الجماعات المتخيلة	٨١-
محمود السيد علي	ميجيل دي أونامونو	مسرح ميجيل	٨٢-
خالد المعالي	غوتفريد بن	مختارات شعرية	٨٣-
عبد الحميد شحبة	مجموعة من المؤلفين	موسوعة الأدب والنقد (ج١)	٨٤-
عبد الرزاق بركات	صلاح زكي أقطاي	منصور الحلاج (مسرحية)	٨٥-
أحمد فتحي يوسف شتا	جمال مير صادق	طول الليل (رواية)	٨٦-
ماجدة العناني	جلال آل أحمد	نون والقلم (رواية)	٨٧-
إبراهيم النسوق شتا	جلال آل أحمد	الابتلاء بالتغريب	٨٨-
أحمد زايد ومحمد محيي الدين	أنتوني جينز	الطريق الثالث	٨٩-
محمد إبراهيم مبروك	بورخيس وآخرون	وسم السيف وقصص أخرى	٩٠-
محمد هناء عبد الفتاح	باربرا لاسوتسكا - بشونباك	المسرح والتجريب بين النظرية والتطبيق	٩١-
نادية جمال الدين	كارلوس ميجيل	لنائب وبشامين المسرح الإسباني المعاصر	٩٢-
عبد الوهاب علوب	مايك فيذرستون وسكوت لاش	محدثات العولمة	٩٣-
فوزية العشماوي	سمويل بيكيت	مسرحيات الحب الأول والصعبة	٩٤-
سري محمد عبد اللطيف	أنطونيو بويرو بايخو	مختارات من المسرح الإسباني	٩٥-
إيوار الخراط	نخبة	ثلاث زينقات ووردة وقصص أخرى	٩٦-
بشير السباعي	فرنان برودل	هوية فرنسا (مج١)	٩٧-
أشرف الصباغ	مجموعة من المؤلفين	الهم الإنساني والابتزاز الصهيوني	٩٨-
إبراهيم قنديل	ديفيد روبنسون	تاريخ السينما العالمية (١٨٩٥-١٩٨٠)	٩٩-
إبراهيم فتحي	بول هيرست وجراهام توميسون	مساطة العولمة	١٠٠-
رشيد بنحدو	بيرنار فاليط	النص الروائي: تقنيات ومناهج	١٠١-
عن الدين الكتاني الإبريسي	عبد الكبير الخطيبي	السياسة والتسامح	١٠٢-
محمد بنيس	عبد الوهاب المؤدب	قبر ابن عربي يليه آية (شعر)	١٠٣-
عبد الغفار مكاوي	برتول بريشت	أوبرا ماهوجني (مسرحية)	١٠٤-
عبد العزيز شبيب	چيرارچينيت	مدخل إلى النص الجامع	١٠٥-
أشرف علي دعور	ماريا خيسوس روبييرامتي	الأدب الأندلسي	١٠٦-
محمد عبد الله الجعدي	نخبة من الشعراء	صورة الفنان في الشعر الأمريكي اللاتيني المعاصر	١٠٧-
محمود علي مكي	مجموعة من المؤلفين	ثلاث دراسات عن الشعر الأندلسي	١٠٨-
هاشم أحمد محمد	جون بولوك وعادل درويش	حروب المياه	١٠٩-
منى قطان	حسنة بيجوم	النساء في العالم النامي	١١٠-
ريهام حسين إبراهيم	فرانسيس هيدسون	المرأة والجريمة	١١١-
إكرام يوسف	أرلين علوي ماكلويد	الاحتجاج الهادي	١١٢-

أحمد حسان	سادى پلانت	راية التمرد	١١٣-
نسيم مجلى	وول شوينكا	مسرحتا حصاد كرنجى وسكان المستنق	١١٤-
سمية رمضان	فرچينيا وولف	غرفة تخص المرء وحده	١١٥-
نهاد أحمد سالم	سينثيا نلسون	امراة مختلفة (درية شفيق)	١١٦-
منى إبراهيم وهالة كمال	ليلى أحمد	المرأة والجنوسة فى الإسلام	١١٧-
لميس النقاش	بث بارون	التهضة النسائية فى مصر	١١٨-
بإشراف: روف عباس	أميرة الأزهرى سنيل	النساء والأسرة وقوانين اللق فى التاريخ الإسلامى	١١٩-
مجموعة من المترجمين	ليلى أبو لغد	الحركة النسائية والتطور فى الشرق الأوسط	١٢٠-
محمد الجندى وإيزابيل كمال	فاطمة موسى	الدليل الصغير فى كتابة المرأة العربية	١٢١-
منيرة كروان	جوزيف فوجت	نظام العبودية القديم والنموذج المثالى للإنسان	١٢٢-
أنور محمد إبراهيم	أننيل ألكسندرو فنالدولينا	الإمبراطورية العثمانية وعلاقاتها الدولية	١٢٣-
أحمد فؤاد بليغ	جون جراى	الفجر الكائن: أوهام الرأسمالية العالمية	١٢٤-
سمحة الخولى	سيدرك ثورپ ديفى	التحليل الموسيقى	١٢٥-
عبد الوهاب علوب	فولفانج إيسر	فعل القراءة	١٢٦-
بشير السباعى	صفاء فتحى	إرهاب (مسرحية)	١٢٧-
أميرة حسن نوزيرة	سوزان باسنيت	الأدب المقارن	١٢٨-
محمد أبو العطا وآخرون	ماريا دولورس أسيس جاروت	الرواية الإسبانية المعاصرة	١٢٩-
شوقى جلال	أندريه جوندر فرانك	الشرق يصعد ثانية	١٣٠-
لويس بقطر	مجموعة من المؤلفين	مصر القيمة التاريخ الاجتماعى	١٣١-
عبد الوهاب علوب	مايك فيذرستون	ثقافة العولة	١٣٢-
طلعت الشايب	طارق على	الخوف من المرايا (رواية)	١٣٣-
أحمد محمود	بارى ج. كيغب	تشريح حضارة	١٣٤-
ماهر شفيق فريد	ت. س. إليوت	المختار من نقد ت. س. إليوت	١٣٥-
سحر توفيق	كينيث كوتو	فلاحو الباشا	١٣٦-
كاميليا صبحى	جوزيف مارى مواريه	مذكرات ضابط فى الحملة الفرنسية على مصر	١٣٧-
وجيه سمعان عبد المسيح	أندريه جلوكسمان	عالم التليفزيون بين الجمال والعنف	١٣٨-
مصطفى ماهر	ريتشارد فاچنر	پارسيغال (مسرحية)	١٣٩-
أمل الجبورى	هوبرت ميسن	حيث تلتقى الأنهار	١٤٠-
نعيم عطية	مجموعة من المؤلفين	اثننا عشرة مسرحية يونانية	١٤١-
حسن بيومى	آ. م. فورستر	الإسكندرية : تاريخ ودليل	١٤٢-
عدلى السمرى	ديرك لايدر	قضايا التنظير فى البحث الاجتماعى	١٤٣-
سلامة محمد سليمان	كارلو جولونى	صاحبة اللوكاندة (مسرحية)	١٤٤-
أحمد حسان	كارلوس فوينتس	موت أرتيميو كروث (رواية)	١٤٥-
على عبدالرؤف البهمى	ميجيل دى لبيس	الورقة الحمراء (رواية)	١٤٦-
عبدالغفار مكاوى	تانكريد نورست	مسرحيتان	١٤٧-
علي إبراهيم منوفى	إنريكي أندرسون إمبرت	القصة القصيرة: النظرية والتقنية	١٤٨-
أسامة حبر	عاطف فضول	النظرية الشعرية عند إليوت واندونيس	١٤٩-
منيرة كروان	روبرت ج. ليتمان	التجربة الإغريقية	١٥٠-

١٥١-	هوية فرنسا (مج ٢ ، ج١)	فرنان برودل	بشير السباعي
١٥٢-	عدالة الهند وتقصص أخرى	مجموعة من المؤلفين	محمد محمد الخطابي
١٥٣-	غرام الفراعنة	فيولين فانويك	فاطمة عبدالله محمود
١٥٤-	مدرسة فرانكفورت	فيل سليتر	خليل كلقت
١٥٥-	الشعر الأمريكي المعاصر	نخبة من الشعراء	أحمد مرسى
١٥٦-	المدارس الجمالية الكبرى	جى أنبال وآلان وأوديت فيرمو	مى التلمساني
١٥٧-	خسرو وشيرين	النظامى الكنجوى	عبدالعزیز يقوش
١٥٨-	هوية فرنسا (مج ٢ ، ج٢)	فرنان برودل	بشير السباعي
١٥٩-	الأيديولوجية	ديفيد هوكس	إبراهيم فتحي
١٦٠-	آلة الطبيعة	بول إيرليش	حسين بيومي
١٦١-	مسرحيتان من المسرح الإسباني	أليخاندرو كاسونا وأنطونيو جالا	زبدان عبدالحليم زبدان
١٦٢-	تاريخ الكنيسة	يوجنا الأسوي	صلاح عبدالعزیز محجوب
١٦٣-	موسوعة علم الاجتماع (ج ١)	جورديون مارشال	بإشراف: محمد الجوهري
١٦٤-	شامبوليون (حياة من نور)	جان لوكوتير	نبيل سعد
١٦٥-	حكايات الثعلب (قصص أطفال)	أ. ن. أفاناسيفا	سهر المصافدة
١٦٦-	العلاقات بين المتنبيين والطنانيين في إسرائيل	يشعياهو ليتمان	محمد محمود أبوغدير
١٦٧-	في عالم طاغور	رايندرنات طاغور	شكرى محمد عياد
١٦٨-	دراسات في الأدب والثقافة	مجموعة من المؤلفين	شكرى محمد عياد
١٦٩-	إبداعات أدبية	مجموعة من المؤلفين	شكرى محمد عياد
١٧٠-	الطريق (رواية)	ميجيل دليبيس	بسام ياسين رشيد
١٧١-	وضع حد (رواية)	فرانك بيجو	هدى حسين
١٧٢-	حجر الشمس (شعر)	نخبة	محمد محمد الخطابي
١٧٣-	معنى الجمال	ولتر ت. ستيس	إمام عبد الفتاح إمام
١٧٤-	صناعة الثقافة السوداء	إيليس كاشمور	أحمد محمود
١٧٥-	التلفزيون في الحياة اليومية	لورينزو فيلشس	وجيه سمعان عبد المسيح
١٧٦-	نحو مفهوم للاقتصاديات البيئية	توم تيتنبرج	جلال البنا
١٧٧-	أنطون تشيخوف	هنرى تروايا	حصه إبراهيم المنيف
١٧٨-	مختارات من الشعر اليوناني الحديث	نخبة من الشعراء	محمد حمدي إبراهيم
١٧٩-	حكايات أنيسوب (قصص أطفال)	أنيسوب	إمام عبد الفتاح إمام
١٨٠-	قصة جاويد (رواية)	إسماعيل فصيح	سليم عبد الأمير حمدان
١٨١-	النقد الأدبي الأمريكي من الثلاثينيات إلى الستينيات	فنسنت ب. ليتش	محمد يحيى
١٨٢-	العنف والنبوة (شعر)	و.ب. بيتس	ياسين طه حافظ
١٨٣-	جان كوكو على شاشة السينما	رينيه جيلسون	فتحي العشري
١٨٤-	القاهرة: حالة لا تنام	هانز إبنورفر	دسوقي سعيد
١٨٥-	أسفار العهد القديم في التاريخ	توماس تومسن	عبد الوهاب علوب
١٨٦-	معجم مصطلحات هيجل	ميخائيل إنود	إمام عبد الفتاح إمام
١٨٧-	الأرض (رواية)	بُرج علوى	محمد علاء الدين منصور
١٨٨-	موت الأدب	ألفين كرتان	بدر الديب

- ١٨٩- العى والبصرة مقالات فى بلاغة النقد المعاصر **بول دى مان**
 ١٩٠- محاورات كونفوشيوس **كونفوشيوس**
 ١٩١- الكلام وأسمال وقصص أخرى **الحاج أبو بكر إمام وأخرون**
 ١٩٢- سياحت نامه إبراهيم بك (ج١) **زين العابدين الراغى**
 ١٩٣- عامل المنجم (رواية) **بيتر أبراهامز**
 ١٩٤- مختارات من النقد الانطو-أمريكي الحديث **مجموعة من النقاد**
 ١٩٥- شتاء ٨٤ (رواية) **إسماعيل فصيح**
 ١٩٦- المهلة الأخيرة (رواية) **فالتين راسبوتين**
 ١٩٧- سيرة الفاروق **شمس العلماء شبلى التعمانى**
 ١٩٨- الاتصال الجماهيرى **إيوين إمري وأخرون**
 ١٩٩- تاريخ يهود مصر فى الفترة العثمانية **يعقوب لاندائو**
 ٢٠٠- ضحايا التنمية: المقاومة والبدائل **جيرمى سيبروك**
 ٢٠١- الجانب الدينى للفلسفة **جوزايا رويس**
 ٢٠٢- تاريخ النقد الأدبى الحديث (ج٤) **رينيه ويليك**
 ٢٠٣- الشعر والشاعرية **ألفاف حسين حالى**
 ٢٠٤- تاريخ نقد العهد القديم **زالمان شاراز**
 ٢٠٥- الجينات والشعوب واللغات **لويجي لوقا كافالى- سفورزا**
 ٢٠٦- الهولوية تصنع علماً جديداً **جيمس جلايك**
 ٢٠٧- ليل أفريقي (رواية) **رامون خوتاسنديز**
 ٢٠٨- شخصية العربى فى المسرح الإسرائيلى **دان أوربان**
 ٢٠٩- السرد والمسرح **مجموعة من المؤلفين**
 ٢١٠- مثنويات حكيم سنائى (شعر) **سنائى الغزنوى**
 ٢١١- فريتمان دوسوسير **جوناثان كلر**
 ٢١٢- قصص الأمير مرزيان على لسان الحيوان **مرزيان بن رستم بن شروين**
 ٢١٣- مصر منذ قدم نابليون حتى رحيل عبدالناصر **ريمون فلالور**
 ٢١٤- قواعد جديدة للمنهج فى علم الاجتماع **أنتونى جينينز**
 ٢١٥- سياحت نامه إبراهيم بك (ج٢) **زين العابدين الراغى**
 ٢١٦- جوانب أخرى من حياتهم **مجموعة من المؤلفين**
 ٢١٧- مسرحيتان طليعيتان **صمويل بيكيت وهارولد بينتر**
 ٢١٨- لعبة الحجلة (رواية) **خوليو كورتاثان**
 ٢١٩- بقايا اليوم (رواية) **كانو إيشجورو**
 ٢٢٠- الهولوية فى الكون **بارى باركر**
 ٢٢١- شعرية كفاوى **جريجورى جوزدانييس**
 ٢٢٢- فرانز كافكا **رونالد جراى**
 ٢٢٣- العلم فى مجتمع حر **بزل فيرابند**
 ٢٢٤- دمار يوغسلافيا **برانكا ماجاس**
 ٢٢٥- حكاية غربى (رواية) **جابريل جارتيا ماركيث**
 ٢٢٦- أرض وقصائد أخرى **ديفيد هريت لورانس**
- سعيد الفانمى
 محسن سيد فرجاني
 مصطفى حجازى السيد
 محمود علاوى
 محمد عبد الواحد محمد
 ماهر شفيق فريد
 محمد علاء الدين منصور
 أشرف الصباغ
 جلال السعيد الحفناوى
 إبراهيم سلامة إبراهيم
 جمال أحمد الرفاعى وأحمد عبد اللطيف حماد
 فخرى ليبي
 أحمد الأنصارى
 مجاهد عبد المنعم مجاهد
 جلال السعيد الحفناوى
 أحمد هويدى
 أحمد مستجير
 على يوسف على
 محمد أبو العطا
 محمد أحمد صالح
 أشرف الصباغ
 يوسف عبد الفتاح فرج
 محمود حمدي عبد الفتى
 يوسف عبد الفتاح فرج
 سيد أحمد على الناصر
 محمد محيى الدين
 محمود علاوى
 أشرف الصباغ
 نادية البنهاوى
 على إبراهيم منوفى
 طلعت الشايب
 على يوسف على
 رفعت سلام
 نسيم مجلى
 محمد نفاذى
 سى نفاذى
 السيد عبدالظاهر السيد
 طاهر محمد على البربرى

السيد عبدالظاهر عبدالله	المسرح الإسباني في القرن السابع عشر	خوسيه ماريا ديث بوركي	٢٢٧-
ماري تيريز عبدالمسيح وخالد حسن	علم الجمالية وعلم اجتماع الفن	جانيت وولف	٢٢٨-
أمير إبراهيم العمري	مأزق البطل الوحيد	نورمان كيجان	٢٢٩-
مصطفى إبراهيم فهمي	عن القباب والفئران والبشر	فرانسواز جاكوب	٢٣٠-
جمال عبدالرحمن	الرافيل أو الجيل الجديد (مسرحية)	خايمي سالوم بيدال	٢٣١-
مصطفى إبراهيم فهمي	ما بعد المعلومات	توم ستونير	٢٣٢-
طلعت الشايب	فكرة الاضمحلال في التاريخ الغربي	أرثر هيرمان	٢٣٣-
فؤاد محمد عكود	الإسلام في السودان	ج. سبنسر تريمجهام	٢٣٤-
إبراهيم السوقي شتا	ديوان شمس تبريزي (ج١)	مولانا جلال الدين الرومي	٢٣٥-
أحمد الطيب	الولاية	ميشيل شونكيفيتش	٢٣٦-
عنايات حسين طلعت	مصر أرض الوادي	روين فيدين	٢٣٧-
ياسر محمد جادالله وعربي مديولى أحمد	العولة والتحرير	تقرير لمنظمة الأنكتاد	٢٣٨-
نادية سليمان حافظ وإيهاب صلاح فايق	العربي في الأدب الإسرائيلي	جيلا راماز - رايوخ	٢٣٩-
صلاح محجوب إدريس	الإسلام والغرب وإمكانية الحوار	كاي حافظ	٢٤٠-
ابتهام عبدالله	في انتظار البرابرة (رواية)	ج. م. كوتزي	٢٤١-
صبري محمد حسن	سبعة أنماط من الغموض	وليام إمبسون	٢٤٢-
بإشراف: صلاح فضل	تاريخ إسبانيا الإسلامية (مج١)	ليفى بروفنسال	٢٤٣-
نادية جمال الدين محمد	الغليان (رواية)	لاورا إسكييل	٢٤٤-
توفيق على منصور	نساء مقاتلات	إليزابيتا أديس وآخرون	٢٤٥-
على إبراهيم منوفى	مختارات قصصية	جابريل جارثيا ماركيت	٢٤٦-
محمد طارق الشرقاوى	الثقافة الجماهيرية والحدث في مصر	والتر أرمبرست	٢٤٧-
عبداللطيف عبدالحليم	حقول عدن الخضراء (مسرحية)	أنطونيو جالا	٢٤٨-
رفعت سلام	لغة التمزق (شعر)	دراجو شتامبوك	٢٤٩-
ماجدة محسن أباطة	علم اجتماع العلوم	دومنيك فينك	٢٥٠-
بإشراف: محمد الجوهري	موسوعة علم الاجتماع (ج٢)	جوردون مارشال	٢٥١-
على بدران	رائدات الحركة النسوية المصرية	مارجو بدران	٢٥٢-
حسن بيومي	تاريخ مصر الفاطمية	ل. أ. سيمينوفا	٢٥٣-
إمام عبد الفتاح إمام	أقدم لك: الفلسفة	ديف روينسون وجودى جروفز	٢٥٤-
إمام عبد الفتاح إمام	أقدم لك: أفلاطون	ديف روينسون وجودى جروفز	٢٥٥-
إمام عبد الفتاح إمام	أقدم لك: ديكارت	ديف روينسون وكريس جارات	٢٥٦-
محمود سيد أحمد	تاريخ الفلسفة الحديثة	وليم كلى رايت	٢٥٧-
عبادة كحيلة	الفجر	سير أنجوس فريزر	٢٥٨-
فاروجان كازانجيان	مختارات من الشعر الأرمني عبر العصور	نخبة	٢٥٩-
بإشراف: محمد الجوهري	موسوعة علم الاجتماع (ج٣)	جوردون مارشال	٢٦٠-
إمام عبد الفتاح إمام	رحلة في فكر زكي نجيب محمود	زكى نجيب محمود	٢٦١-
محمد أبو العطا	مدينة المعجزات (رواية)	إيواريو منوثا	٢٦٢-
على يوسف على	الكشف عن حافة الزمن	چون جرين	٢٦٣-
لويس عوض	إبداعات شعرية مترجمة	هوراس وشلي	٢٦٤-

- ٢٦٥- روايات مترجمة أوسكار وايلد وصمويل جونسون
٢٦٦- مدير المدرسة (رواية) جلال آل أحمد
٢٦٧- فن الرواية ميلان كونديرا
٢٦٨- ديوان شمس تبريزي (ج٢) مولانا جلال الدين الرومي
٢٦٩- وسط الجزيرة العربية وشرقها (ج١) وليم جيفور بالجريف
٢٧٠- وسط الجزيرة العربية وشرقها (ج٢) وليم جيفور بالجريف
٢٧١- الحضارة الغربية: الفكرة والتاريخ توماس سي. باترسون
٢٧٢- الأديرة الأثرية في مصر سي. سي. والترز
٢٧٣- الأصول الاجتماعية والثقافية لحركة عربى في مصر جوان كول
٢٧٤- السيدة باربارا (رواية) رومولو جاييجوس
٢٧٥- ت. س. إليوت شاعرًا وناقدًا وكاتبًا مسرحيًا مجموعة من النقاد
٢٧٦- فنون السينما مجموعة من المؤلفين
٢٧٧- الجينات والصراع من أجل الحياة براين فورد
٢٧٨- البدايات إسحاق عظيموف
٢٧٩- الحرب الباردة الثقافية ف.س. سوندرز
٢٨٠- الأم والنصيب وقصص أخرى بريم شند وآخرون
٢٨١- الفربوس الأعلى (رواية) عبد الحليم شرر
٢٨٢- طبيعة العلم غير الطبيعية لويس وولبرت
٢٨٣- السهل يحترق وقصص أخرى خوان رولفو
٢٨٤- هرقل مجنونًا (مسرحية) يوربيديس
٢٨٥- رحلة خواجه حسن نظامى الدهلوى حسن نظامى الدهلوى
٢٨٦- سياحت نامه إبراهيم بك (ج٢) زين العابدين المراغى
٢٨٧- الثقافة والعولة والنظام العالمى أنتونى كنج
٢٨٨- الفن الروائى ديفيد لودج
٢٨٩- ديوان منوچهرى الدامغانى أبو نجم أحمد بن قوص
٢٩٠- علم اللغة والترجمة جورج مونان
٢٩١- تاريخ المسرح الإشباني فى القرن العشرين (ج١) فرانثسكو رويس رامون
٢٩٢- تاريخ المسرح الإشباني فى القرن العشرين (ج٢) فرانثسكو رويس رامون
٢٩٣- مقدمة للأدب العربى روجر آلن
٢٩٤- فن الشعر بوالو
٢٩٥- سلطان الأسطورة جوزيف كامبل وبيل موريز
٢٩٦- مكبث (مسرحية) وليم شكسبير
٢٩٧- فن النحو بين اليونانية والسريانية نيونيسيوس ثراكس ويوسف الأهوازي
٢٩٨- مأساة العبيد وقصص أخرى نخبة
٢٩٩- ثورة فى التكنولوجيا الحيوية جين ماركس
- لويس عوض
عادل عبدالمنعم على
بدر الدين عرودكى
إبراهيم الدسوقي شتا
صبرى محمد حسن
صبرى محمد حسن
شوقى جلال
إبراهيم سلامة إبراهيم
عنان الشهاوى
محمود على مكى
ماهر شفيق فريد
عبدالقادر التلمسانى
أحمد فوزى
ظريف عبدالله
طلعت الشايب
سمير عبدالحميد إبراهيم
جلال الحفناوى
سمير حنا صادق
على عبد الرزاق البعبي
أحمد عثمان
سمير عبد الحميد إبراهيم
محمود علاوى
محمد يحيى وآخرون
ماهر البطوطى
محمد نور الدين عبدالمنعم
أحمد زكريا إبراهيم
السيد عبد الظاهر
السيد عبد الظاهر
مجدى توفيق وآخرون
رجاء ياقوت
بدر الديب
محمد مصطفى بلى
ماجدة محمد أنور
مصطفى حجازى السيد
هاشم أحمد محمد

طبع بالهيئة العامة لشئون المطابع الأميرية

رقم الإيداع ٢٠٣٧٤ / ٢٠٠٥

منتدى إقرأ الثقافي

للكتب (كوردى - عربى - فارسى)

www.iqra.ahlamontada.com

Revolution in Biotechnology

يشتمل هذا الكتاب على ستة عشر فصلا . والتي تعتمد أساسا على دراسة الوراثة والجينات فى الكائنات الحية الدقيقة ، ومدى الاستفادة منها فى تخليق البروتين . وكذلك دراسة الأحماض النووية (RNA و DNA) . وكذلك دراسة تثبيت النتروجين ودور البكتيريا فيه . ففى مجال الطب قدمت الهندسة الوراثية أمالا كبيرة لإمكانية الشفاء من كثير من الأمراض الوراثية . ومن أكثرها خطورا الايدز والسرطان . وفى مجال الصيدلة وصناعة الدواء أصبح فى متناول المرضى الكثير من منتجات الهندسة الوراثية التى شملت اللقاحات والأمصال والأنترفيرون وهرمون الاتسولين وهرمون النمو البشرى . وفى مجال المنتجات الصناعية المهندسة وراثيا ظهر فى الأسواق المطاط والبلاستيك والألياف والمبيدات الحشرية ومنظمات النمو والأسمدة والمبيدات العضوية والمنظفات البيولوجية . وأمكن استخدام سلالات من البكتيريا فى تخليص البيئة من التلوث .